

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSGRADO

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS
AISLADAS DE DENGUE 2 EN PERU; 2000-2010**

TESIS

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN
BIOQUÍMICA**

AUTOR

Cristhopher Donat's Cruz Malpica

Lima – Perú

2013

Dedicado a:
Mi esposa Diana, a mis hijos Carlos Andrés, Mariana y a toda mi familia

Agradecimientos

Fue un largo trayecto lleno de interesantes anécdotas, aprendizaje de diferentes técnicas de análisis, resultados interesantes y sobre todo de satisfacciones. El presente trabajo no pudo ser realidad sin el apoyo constante del equipo de virología del NAMRU-6.

Gracias a Roxana Caceda y Zonia Rios, por su invaluable aporte y labor constante en el área de aislamiento viral que hicieron posible el estudio con cepas aisladas de dengue 2 durante una década.

Un agradecimiento especial a Carolina Guevara por su amistad, constante apoyo y empuje para que este trabajo se haga realidad.

Quiero agradecer también al equipo de molecular (Vidal, Diana, Vicky, Pedro, Gilda y Gladys) por su apoyo continuo, consejos y sugerencias.

A los doctores Brett, Halsey y Kochel que con su gran experiencia aportaron al desarrollo de la investigación, a mi asesor Mario Montegirfo por su revisión crítica y sugerencias; a Uds. quiero agradecerles.

Por supuesto a lo más grande que tiene cualquier persona, la familia. Gracias a mis padres Andrés y Gloria por su apoyo moral, preocupación y consejos. A mi hermanita Lisette por su apoyo incondicional. A mis tíos Soledad y Rafael que con su energía me inyectaron dosis de motivación para seguir siempre adelante pese a las adversidades. A mi abuelita Trifunia de quien siempre he recibido ejemplo de sabiduría.

Mención especial de agradecimiento para mi esposa Diana, que estuvo escuchando, apoyando, aportando dándome de su tiempo, paciencia y amor. A su hermosa familia gracias por traerla al mundo y a Dios por ponerla en mi camino. De la misma forma a mis hijos Carlos y Mariana por su cariño, amor y comprensión en el tiempo restado con Uds.

De todo corazón gracias Dios; y a todos los demás que no he mencionado, les expresaré mi agradecimiento personalmente.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ABREVIACIONES

RESUMEN

ABSTRACT

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del Problema	2
1.3 Justificación	3
1.4 Objetivo	4
1.4.1 Objetivo General	
1.4.2 Objetivos Específicos	
1.5 Valor Teórico	4
1.6 Valor Práctico	5
CAPITULO 2: MARCO TEÓRICO	6
2.1 Arbovirus	6
2.2 Historia del Dengue	6
2.3 Agente Etiológico del Dengue	9
2.4 Genoma Viral	10
2.5 Proteínas Virales	12
2.6 Ciclo de Replicación del Dengue	15
2.7 Patogénesis	16
2.8 Diagnóstico de Laboratorio	24
2.9 Variabilidad Genética del Virus Dengue	25
2.10 Genotipos de Dengue 2	26

CAPITULO 3: METODOLOGÍA	
3.1 Aislamiento viral	27
3.2 Aislamientos de Dengue 2 estudiados	28
3.3 Extracción de ARN	29
3.4 Identificación del Virus Dengue 2 mediante Técnicas Moleculares	30
3.5 Amplificación y Secuenciación Nucleotídica del Gen de la Envoltura de los Aislamientos Peruanos	32
3.6 Análisis Filogenético a partir de las Secuenciadas obtenidas del Gene de la Envoltura	34
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Aislamiento, RT-PCR y Secuenciamiento	37
4.2 Análisis de la comparación nucleotídica del gen E	40
4.3 Análisis filogenético de la secuencia nucleotídica del gen E	42
4.4 Análisis de la secuencia aminoacídica del gen E	54
CAPITULO 5: CONCLUSIONES	58
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INDICE DE TABLAS

TABLA N°		Pág.
1.	Relación de los aislamientos estudiados	28
2.	Cebadores diseñados en la presente tesis	32
3.	Relación de las secuencias obtenidas del Gen Bank	35
4.	Resultado de la comparación nucleotídica y aminoacidica entre las cepas peruanas con las cepas representativas del genotipo Americano (Tonga 74) y el genotipo Americano/Asiático (Jamaica 83)	41
5.	Resultado de la prueba para encontrar el mejor modelo de sustitución nucleotídica utilizando el model test opción incluida en el MEGA 5.0	43
6.	Comparación de aminoácidos entre cepas del genotipo Americano/Asiático	56

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		Pág.
1.	Incidencia de Dengue en las Américas 1980-2010	8
2.	Genoma del virus Dengue mostrando cada uno de los genes	11
3.	Hipótesis integral en la patogenia del Dengue	20
4.	Clasificación de la enfermedad por Dengue	23
5.	Electroforesis mostrando resultados positivos para Dengue 2 mediante la técnica de Lanciotti usada para la confirmación molecular de los aislamientos positivos. A. RT-PCR y B. Nested PCR	38
6.	Electroforesis mostrando resultados de RT-PCR usando los cuatro cebadores diseñados para la amplificación y secuenciamiento del gen de la envoltura.	39
7.	A) Árbol filogenético utilizando el método de Neighborn Joining	45
	B) Rama del genotipo Americano/Asiático mostrando los diferentes clados (1 y 2) y sub-clados (A, B, C, D y E)	46
8.	A) Árbol filogenético utilizando el método de Maximun Likelihood	47
	B) Rama del genotipo Americano/Asiático mostrando los diferentes clados (1 y 2) y sub-clados (A, B, C, D y E)	48
9.	A) A) Árbol filogenético utilizando el método de Parsimonia	49
	B) Rama del genotipo Americano/Asiático mostrando los diferentes clados (1 y 2) y sub-clados (A, B, C, D y E)	50

ABREVIACIONES

ADA: Amplificación dependiente de anticuerpos

ARN: Ácido Ribonucleico

E: Envoltura

FD: Fiebre del Dengue

FHD: Fiebre hemorrágica del Dengue

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

ML: Método de análisis filogenético basado en máxima verosimilitud (siglas en inglés, Maximum Likelihood)

MP: Método de análisis filogenético basado en máxima parsimonia (siglas en inglés, Maximum Parsimony)

NCBI: Centro nacional para información biotecnológica (siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information)

NCR: Región no codificante (siglas en inglés, Noncoding Region)

NJ: Método de análisis filogenético basado en una matriz de distancia (siglas en inglés, Neighbor-Joining)

NS: No estructural (siglas en inglés, Nonstructural)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ORF: marco de lectura abierto (siglas en inglés, Open Reading Fragment)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction)

RT: Transcripción reversa (siglas en inglés, Reverse Transcription)

SCD: síndrome de choque por Dengue.

VDEN: Virus Dengue

WHO: Organización Mundial de la Salud (siglas en Inglés, World Health Organization)

RESUMEN

El virus Dengue (VDEN) es el responsable de más de 50-100 millones de casos anualmente en el mundo. La infección del dengue es causada por cuatro serotipos (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4) y el espectro de la enfermedad varía desde una fiebre indiferenciada, fiebre hemorrágica por dengue (FHD), síndrome de shock por dengue, y muerte. Información epidemiológica liga el desarrollo de FHD con una infección secundaria y además sugiere que ciertas cepas son más virulentas que otras. En 2001, aparecieron los primeros casos de FHD asociados con VDEN-2 en la costa del Perú. En el 2010 ocurrió un brote en Iquitos con casos severos convirtiéndose en el más largo en la historia de la región. Sin embargo estudios orientados en determinar el origen distribución y diversidad genética de cepas peruanas de VDEN-2 durante los diez últimos años no han sido realizados. Para atender este vacío de conocimiento en la epidemiología del VDEN-2 en Perú, extractos de ARN de 30 aislamientos virales en células C6/36 (*Aedes albopictus*) fueron procesados por RT-PCR. Secuencias del gen de la envoltura (E) fueron determinadas y comparadas con muestras globales de VDEN-2. El análisis filogenético reveló la circulación de dos genotipos en Perú: Americano (hasta el 2000) y Americano/Asiático (2000-2010). Adicionalmente se identificaron cepas variantes del genotipo Americano/Asiático distribuidos en dos clados principales (1 y 2) que ingresaron al Perú por la costa norte (Ecuador) y por la selva (Brasil o Bolivia). Con el aparente incremento de la virulencia relacionada a cepas Americano/Asiático del clado 2, nuestros resultados soportan la necesidad de un continuo monitoreo de cepas emergentes de nuevos variantes o genotipos de dengue que podrían estar asociados a casos severos de la enfermedad.

Palabras claves: Arbovirus, Dengue 2, Americano/Asiático y relación filogenética.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is responsible for more than 50-100 million cases annually throughout the world. Dengue infection is caused by four different dengue serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4) and the clinical spectrum of disease ranges from dengue fever, dengue hemorrhagic fever (DHF), dengue shock syndrome, and death. Epidemiological information has linked the development of DHF with secondary dengue infections and has also suggested that certain DENV strains are more virulent than others. In 2001, the first DHF cases associated with DENV-2 virus were recognized in the coastal region of Peru. In 2010 severe cases from an outbreak in Iquitos were registered; and resulted in the largest DHF epidemic that region had ever experience. However, studies to address the origins, distribution, and genetic diversity of Peruvian DENV-2 strains from the last ten years have not been performed. To address this knowledge gap, RNA extracted from 30 viruses isolated in C6/36 (*Aedes albopictus*) cells were performed by RTPCR. The envelope (E) sequences were determined and used in a phylogenetic comparison with a global sample of DENV-2 viruses. Phylogenetic analysis confirmed the circulation of two DENV-2 genotypes in Peru: American (prior to 2001) and American/Asian (2000-2010). Additionally we identified American/Asian genotype variants from two clades (1 and 2) were introduced into Peru from the north (Ecuador) and the east (Brazil or Bolivia). In light of evidence for increased virulence of clade 2, our results support the need for continuous monitoring for emerging strains of new DENV variants or genotypes that may be associated with severe disease.

Key words: Arbovirus, Dengue 2, American/Asian, and phylogenetic relationship.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

La fiebre del dengue (FD) y su forma severa o grave, el dengue hemorrágico/síndrome de choque por dengue (DH/SCD) constituyen hoy la enfermedad arboviral mas importante en el mundo. Esta enfermedad afecta a más de 100 países, fundamentalmente localizados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Existen en el mundo aproximadamente 2.5 billones de personas con riesgo de infectarse con el virus dengue (VD); cerca de 100 países y áreas tienen riesgo doméstico de contraer la infección, lo que representa un número aproximado de 100 millones de personas infectadas por VD anualmente. El número de casos se ha duplicado en el 2010 con respecto al 2008. En el 2010 1.6 millones de casos de dengue fueron reportados en las Américas de los cuales 49 000 casos fueron severos. Su distribución geográfica se relaciona al hábitat de vector transmisor, el mosquito *Aedes aegypti* (WHO, 2009; Halstead, 2007).

El virus del dengue pertenece al género *flavivirus* (Familia *Flaviviridae*) y comprende cuatro serotipos (VDEN-1, VDEN 2, VDEN 3 y VDEN 4). La infección por cualquiera de los serotipos puede producir diferentes formas clínicas de la enfermedad con un amplio espectro que va desde un cuadro clínico leve hasta la forma más severa como el síndrome de choque por dengue (Rothman, 1999; PAHO 1994). Aunque diversas hipótesis han tratado de explicar la patogénesis del dengue, las hipótesis (no mutuamente exclusivas) de amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) y existencia de cepas con mayor virulencia, son comúnmente mencionadas para explicar la patogénesis de la forma severa de la enfermedad (Halstead, 1988).

Se han planteado numerosos factores de riesgo que implican el desarrollo de la forma severa de la enfermedad, dentro de los que se incluyen las variaciones que experimentan los virus, factores dependientes del hospedero, factores relativos al vector, factores epidemiológicos y las condiciones ecológicas (Kuori, 1989).

Es importante destacar las variaciones genotípicas en los diferentes serotipos de dengue, que puedan tener una mayor influencia en el desarrollo del dengue hemorrágico o del síndrome de choque por dengue, como es el caso del VDEN-2 genotipo americano, que no indujo al dengue hemorrágico en el Perú, a diferencia del genotipo asiático del mismo VDEN-2 que sí desarrolló dengue hemorrágico en personas con infección previa por dengue por otros serotipos como el dengue 1 (Kochel, 2002; Watts, 1999).

Por lo que la variación antigénica intra-serotípica (subtipos genéticos) podría estar asociada con manifestaciones severas de la enfermedad. También se ha demostrado la presencia de varias poblaciones virales en un mismo hospedero (Wang, 2002) y puede darse recombinación entre cepas, probablemente en razón a la circulación simultánea de genotipos diferentes de un serotipo en un mismo hospedero (Holmes, 2003; Twiddy, 2003), esto puede hacer pensar que la diversidad genética de este virus del dengue puede inducir a la aparición de cepas que puede replicarse más rápidamente o ser más patógenas.

1.2 Formulación del Problema

Existe un incremento de casos de dengue y dengue severo a través de los años en América. Se conoce que el Dengue 2 variedad asiática, es el más agresivo y probable causante del Dengue severo hemorrágico. Se identificó la variante asiática del dengue 2 durante un gran brote en el 2000 (Montoya, 2003) donde se registraron casos de dengue severo hemorrágico relacionados a este genotipo. Luego en el 2010 se registraron casos de

dengue severo durante un brote en Iquitos relacionado al mismo genotipo ([Suárez-Ognio, 2011](#)). Sin embargo el bajo índice de casos de dengue hemorrágico en Perú en relación con otros Países ([RedHum](#)), y la ausencia de estudios epidemiológicos moleculares del dengue 2 que comprenda la última década, generan un vacío en el conocimiento de los genotipos de VDEN-2 y sus variantes que están circulando en nuestro país.

1.3 Justificación

Consecuentemente, se consideró apropiado realizar la caracterización molecular de aislamientos peruanos de Dengue 2 obtenidos en diferentes brotes desde el 2000 hasta el 2010 mediante el análisis de la secuencia del gen E, por considerarse diana para la formación de anticuerpos neutralizantes y para la respuesta inmune de células T, así como el determinante fundamental del tropismo de los flavivirus ([Despres, 1993](#)). Adicionalmente se consideró necesario establecer la relación filogenética de nuestras cepas con las circulantes en países vecinos y determinar el origen o ingreso de nuevas variantes que podrían causar un impacto en nuestro país.

1.4 Objetivo

1.4.1 Objetivo general

- Caracterización molecular de las cepas aisladas de VDEN-2 en Perú durante la década del 2000 al 2010.

1.4.2 Objetivos específicos:

- Hallar las diferencias genéticas entre los genotipos circulantes en un segmento aproximadamente de 1458pb, pertenecientes a la región entera de la envoltura.
- Definir la relación genética y origen de las cepas aisladas durante la década, mediante la construcción de árboles filogenéticos y comparación aminoacídica, utilizando cepas de otros países cuyas secuencias se encuentran en la base de datos de genes (GenBank: National Center for Biotechnology Information- NCBI).

1.5 Valor teórico

- Por primera vez en Perú se logra obtener secuencias nucleotídicas del gen de la envoltura de las cepas circulantes en diferentes provincias peruanas durante la última década.
- Estos resultados nos permitieron ver si existen mutaciones particulares relevantes en relación con las cepas de los países vecinos.
- Los estudios presentados son de gran valor científico debido a que contribuye al entendimiento de la epidemiología del dengue 2 en América del Sur.

1.6 Valor práctico

- Se diseñaron 4 cebadores de utilidad en la amplificación y secuenciación del gen de la envoltura, lo que permite continuar con estudios de dengue 2 en el futuro.
- Las secuencias obtenidas en este trabajo serán depositadas en las base de datos del GenBank y estarán disponibles para nuevos estudios epidemiológico-moleculares que permitan entender la evolución del dengue 2 en las Américas.
- Los resultados obtenidos son de utilidad en la aplicabilidad, mejoramiento o desarrollo de vacunas.
- Resultados parciales de este trabajo fueron presentados en un evento científico reconocido internacionalmente realizado en los Estados Unidos de Norteamérica: Annual meeting of The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH).

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Arbovirus

Los virus transmitidos por artrópodos o arbovirus (del inglés, arthropod borne) son causantes de importantes enfermedades en el mundo. Estos virus son transmitidos entre hospederos vertebrados por artrópodos vectores son los mosquitos, las garrapatas, los culicoides y los flebótomos. Una vez que se infectan, permanecen infectados toda su vida. Los arbovirus incluyen a una variedad de virus ARN pertenecientes principalmente a las familias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*. La habilidad de estos virus para causar enfermedades en humanos depende de factores que van desde epidemiológicos hasta genético virales ([Weaver, 2010](#)).

2.2 Historia del Dengue

El Dengue es una enfermedad viral, de carácter endémico-epidémico, el virus dengue (VDEN) es transmitido a humanos mediante la picadura de mosquitos infectados principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* ([Gubler, 1998](#)) y constituye hoy la arbovirosis más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico en áreas tropicales y sub tropicales ([Kindhauser, 2003](#); [Guzmán, 2004](#)). Se estima que 50 millones de infecciones ocurren cada año y unos 2,5 mil millones de personas (dos quintos de la población mundial) corren el riesgo de contraer la enfermedad ([Guha-Sapir, 2005](#)).

Los primeros reportes de brotes compatibles con la enfermedad del dengue datan de los años 1770 – 1780 y se dieron en tres partes del mundo; Asia, África y Norte América ([Hirsch, 1883](#); [Howe 1977](#)) indicando desde ya que el virus y su vector tenían una distribución global; no obstante, cuadros clínicos similares se encuentran registrados incluso desde la Dinastía de Chin (265 - 420 A.D).

En Latinoamérica las primeras epidémicas compatibles con el dengue clásico se dieron en las Antillas francesas (1635) y Panamá (1699) y como dengue hemorrágico en Filipinas (1954) ([Quinlos, 1954](#)). Programas de erradicación del mosquito *Aedes aegypti* mantuvieron alejado al dengue durante casi tres décadas en las Américas (50, 60, e inicios de los 70'), sin embargo la falta de continuidad de estas políticas hizo posible la reintroducción del virus con sus cuatro serotipos causando las mayores epidemias de dengue hemorrágico ([Gubler, 1987](#); [1989](#)). Antes de los 70'se tenía como cepas circulantes solamente a los serotipos VDEN-2 y VDEN-3; posteriormente se introdujeron Den-1 en Jamaica durante 1977, y una nueva cepa de VDEN-2 (Asiática) en 1981 la cual ocasionó una de las más grandes epidemia por dengue hemorrágico en Cuba que se diseminó rápidamente hacia Venezuela, Colombia, Brasil y Puerto Rico; ese mismo año se registró además la introducción del Den-4. Años más tarde (1994) reapareció la cepa VDEN-3 en Nicaragua; sin embargo, difería de la que se registró años anteriores, y se relacionó más bien con las cepas Asiáticas, este serotipo causó una gran cantidad de casos de DH ([Gubler, 1998](#); [Cabezas, 2005](#)).

Los casos de Dengue se han visto incrementados en 4.6 veces aproximadamente durante las tres últimas décadas (de alrededor de 1 millón de casos en los 80s a 4.7 millones durante 2000-2007) ([San Martín, 2010](#)). Fig1.

El número de casos de dengue severo con manifestaciones hemorrágicas (DH) en el mismo período fue de 106.037. El número total de muertes por dengue de 2001 a 2007 fue de 1.299, con una tasa de letalidad por la forma hemorrágica de 1,2%. Los cuatro serotipos del virus del dengue (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4) circulan en la región. ([PAHO, 2008](#))

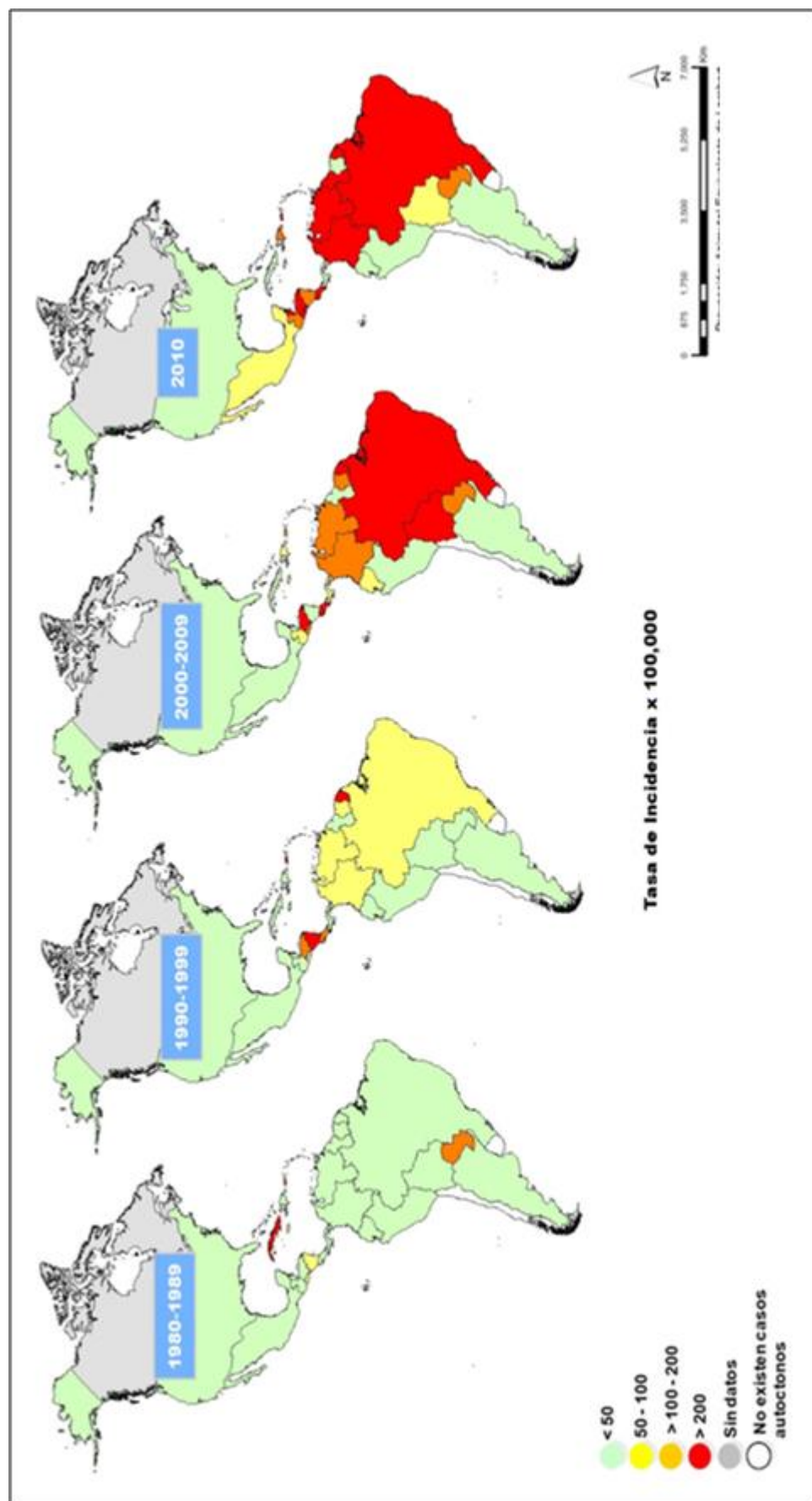


Figura 1. Incidencia de Dengue en las Américas 1980-2010

Fuente: Países que reportan a OPS/OMS. Consolidado: Programa Regional de Dengue OPS

2.3 El Agente Etiológico del Dengue

El complejo Dengue lo constituyen cuatro serotipos de dengue que son distinguidos mediante ensayos de neutralización (VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3, y VDEN-4). Los viriones maduros como miembros de la familia Flavivirus consisten de un RNA de cadena simple de 11Kb en longitud, protegida por una nucleocápside de 30nm de diámetro aproximadamente que a su vez está cubierta por una envoltura de lípidos de aproximadamente 10nm de espesor por lo que el virion tiene una forma icosaédrica de 40-50nm de diámetro aproximadamente. Existen características antigénicas y serológicas distintas entre los cuatro serotipos pudiendo presentar variaciones genéticas dentro de un mismo serotipo que podría relacionarse con la virulencia (genotipos) y con la procedencia geográfica de la zona (topo tipos) ([Rico-Hesse, 1990](#)). Cualquiera puede producir formas graves de la enfermedad, aunque los serotipos 2 y 3 han estado asociados con una cantidad mayor de casos graves y fallecidos ([Gubler, 1998](#)).

La constitución lipoproteica de la envoltura de los viriones les confiere una elevada sensibilidad al tratamiento con cloroformo, formaldehído, peróxido de hidrógeno, alcohol y yodo. Además, son sensibles a enzimas hidrolíticas que generan pérdida de ciertas propiedades antigénicas. La infectividad viral se preserva bien a bajas temperaturas y a valores de pH entre 8,4 y 8,8. Son inactivados por la luz ultravioleta, las radiaciones gamma y las altas temperaturas. A 50 °C, se pierde el 50% de la infectividad en 10 min. Se pueden conservar por años a -70 °C y son estables de forma liofilizada a 4°C ([Burke, 2001](#)).

2.4 Genoma Viral

El ARN viral de cadena simple es de sentido positivo y se comporta como ARN mensajero durante la síntesis de las proteínas virales. Presenta un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una poliproteína precursora que es procesada antes y después de la traducción por proteasas celulares y virales. El genoma viral codifica para 3 proteínas estructurales y para 7 proteínas no estructurales (NS). Las estructurales están compuestas por Cápside (C), Membrana (M) y la Envoltura (E). En el caso de las no estructurales son la NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4a, NS4B y NS5 ([Lindenbach, 2001](#); [Monath, 2002](#)).

En ambos extremos, 5' y 3' están presentes regiones no codificantes (NCR). Estas comprenden secuencias conservadas, que dirigen el proceso de amplificación, traducción, y empaquetamiento del genoma. Existe complementariedad reversa entre la NCR 5' y la NCR 3', regiones que forman el sitio de inicio de la síntesis de la cadena positiva y negativa respectivamente ([Condict, 2001](#)).

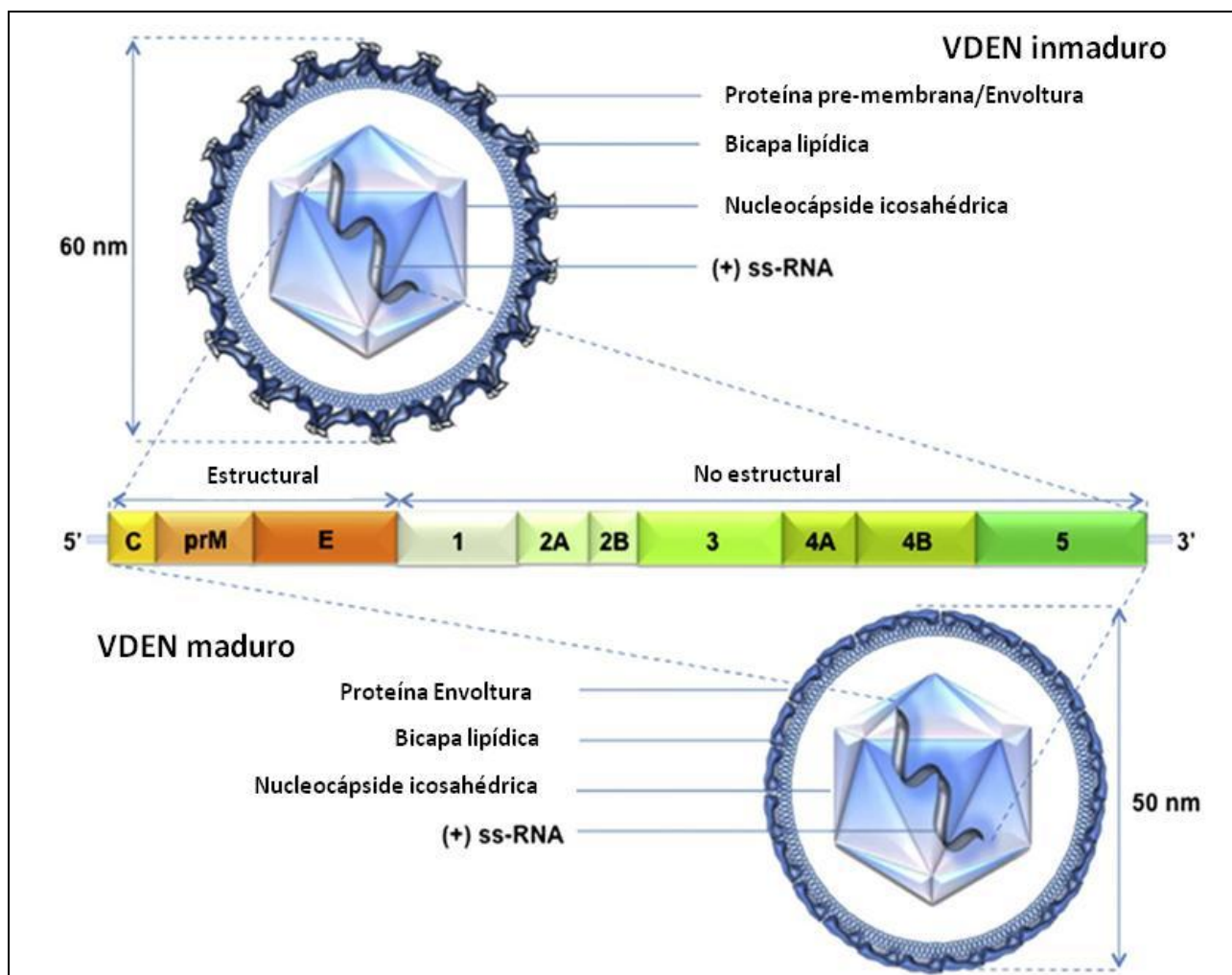


Figura 2. Genoma del virus Dengue mostrando cada uno de los genes

2.5 Proteínas Virales

Proteínas estructurales

La proteína C es de aproximadamente 12kDa, de carácter básico, cargado positivamente y rica en residuos de arginina y lisina. Estas características facilitan su interacción con el ARN viral favoreciendo la formación de la nucleocápside. Es el primer polipéptido sintetizado durante la traducción. Su dominio carboxilo terminal actúa como transductor de señales a través de la membrana que media la inserción del precursor prM dentro del retículo endoplasmático rugoso ([Murray, 1993](#)).

La proteína prM cuyo peso aproximado es de 26kDa es escindida proteolíticamente, dando lugar a la proteína 8kDa. La formación de M a partir de la prM parece ser crucial en la morfogénesis del virus, lo que implica una reorganización estructural en la superficie del virus con la consecuente infectividad de esta forma la proteína precursora se localiza en los viriones inmaduros intracelulares y la proteína M en los viriones extracelulares, la liberación de los viriones coincide con el clivaje de la prM. El clivaje de la prM genera a su vez un fragmento pr de características hidrofílicas, contiene de uno a tres sitios de glicosilación y seis residuos de cisteína conservados formando puentes disulfuro. El papel de esta proteína no está bien dilucidada ([Condict, 2001](#); [Vazquez, 2002](#)).

La glicoproteína E tiene un peso molecular aproximado de 53kD y constituye la principal proteína estructural de los flavivirus. Está constituida por tres dominios (I, II, III) en los cuales predomina la hoja plegada como estructura secundaria. ([Chambers, 1990](#)). La proteína E aparece intracelularmente como un heterodímero E-prM y como homotrímero en la superficie del virión maduro. Existe evidencia que en el heterodímero, la prM estabiliza los epítopes de la proteína E sensibles al pH bajo evitando cambios conformacionales irreversibles.

En la proteína E radican las principales funciones biológicas del virión tales como: inducción de anticuerpos neutralizantes, inmunoamplificadores e inhibidores de la hemaglutinación, tropismo tisular, maduración viral, enlace al receptor celular y fusión de membrana catalizada por ácidos, necesaria para la infección ([Despres, 1993](#)). En la misma se ha determinado la presencia de epítopes de células T, también de importancia en la inmunidad y la patogenia de la enfermedad. Los determinantes antigénicos de la proteína E han mostrado especificidad de grupo, complejo y tipo, también de subcomplejo, genotipo, cepa y sub cepa ([Young, 1990](#)).

Proteínas no estructurales

NS1 es una glicoproteína de 39kD aprox. asociada a la célula. Es capaz de inducir la formación de antígenos fijadores del complemento. Es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso como una glicoproteína monomérica, formándose en un periodo corto un homodímero que es transportada al aparato de Golgi donde sufre modificaciones para poder ser liberado al medio extracelular ([Murray, 1993](#)).

Algunas mutaciones a esta proteína afecta la virulencia de la partícula viral. Es conocido que la célula infectada expresa la proteína en la superficie celular, siendo diana de la citólisis inmunológica realizada por las células T citotóxicas o por la reacción mediada por anticuerpos específicos. Por esta razón se estudia el uso potencial de la NS1 en la protección del hombre contra la infección por Flavivirus, inclusive algunos estudios correlacionan los elevados niveles de NS1 circulante encontrados en la fase temprana con el desarrollo de formas severas de la enfermedad. ([Libraty, 2002](#)).

NS2 está conformada por dos proteínas NS2A y NS2B. la primera tiene un peso aproximado de 22kDa mientras que la segunda tiene 14kDa. La NS2A puede encontrarse atravesando la membrana y en sitios de replicación del ARN. Esta proteína puede actuar en el reclutamiento de las copias de ARN por la replicasa unida a la membrana. La NS2B presenta una región hidrofílica central conservada, que se encuentra flanqueada por segmentos hidrofóbicos, esta se encuentra formando un complejo con NS3 y es un

cofactor requerido para la función de la serin proteasa de NS3. ([Amberg, 1999](#); [Condit, 2001](#); [Shafee, 2003](#); [Wu, 2003](#)).

La proteína NS3 tiene un peso de 70kDa y es altamente conservada entre los flavivirus. Se piensa que pertenece a la maquinaria enzimática utilizada en la replicación del ARN viral. Estudios sugieren que es trifuncional, con actividad de proteasa, helicasa y actividad de ARN trifosfatasa. Se asocia a la membrana a través de su interacción con NS2B. El extremo N terminal de NS3 contiene el dominio catalítico de la proteasa NS2B-NS3, parecida a la serin proteasa de las subfamilias de la tripsina. Se considera que esta enzima participa como proteasa en el clivaje de NS2B, NS3, NS4A y NS5 y del extremo carboxilo de la proteína C. ([Falgout, 1991](#); [Preugschart, 1991](#)).

La proteína NS4 está conformada por NS4A y NS4B, que son de aproximadamente 16kDa y 27kDa respectivamente. Se plantea que NS4A participa en la replicación del ARN, quizás anclando componentes de la replicasa a la membrana celular. La NS4B también se encuentra en sitios de replicación del ARN pero además aparece dispersa en la membrana citoplasmática y en el núcleo. ([Condit, 2001](#)).

La última proteína codificada en el marco abierto de lectura es la NS5 con un peso aproximado de 103kDa y es una de las mas conservadas en los flavivirus. Es una proteína básica y funciona como una ARN polimerasa ARN dependiente. Presenta una homología con enzimas metiltransferasas involucradas en la formación de la capsida del ARN, por lo que probablemente esta proteína participa en la metilación de la capsida del extremo 5' del ARN viral. ([Condit, 2001](#); [Johansson, 2001](#); [Brooks, 2002](#)).

2.6 Ciclo De Replicación Del Dengue

Entrada y desensamble

El dengue se une a receptores de membrana de la célula huésped mediante la glicoproteína de la envoltura (E), siendo este paso crítico para la infectividad ([Anderson, 1992](#)). El dominio III de la envoltura interacciona con el complejo receptor el cual puede incluir el glicosaminoglicano heparán sulfato (HS). Dado que el HS está presente en diferentes tipos de células, el virus puede adherirse a distintos tipos celulares. En el caso de las células dendríticas de langerhans presentes en la piel del huésped humano y que son las primeras que se infectan con dengue, la unión ocurre entre la lectina de unión a ICAM3, DC-SIGN o CD 209, y los residuos de manosa de la Asn 67 de la proteína E ([Navarro-Sanchez, 2003](#); [Tassaneetrithep, 2003](#); [Lozach, 2005](#)). El virus ingresa a la célula por un proceso de endocitosis; luego la acidificación del medio provoca un cambio conformacional en la proteína E ([Modis, 2004](#)), lo que facilita la fusión de la envoltura viral con la membrana endosómica, para luego liberar la nucleocápside hacia el citoplasma ([Rice, 1996](#)).

Traducción y procesamiento de la poliproteína

Una vez liberado el material genético a partir de las cadenas de RNA⁺ se da la síntesis de la poliproteína viral. de ARN positivo puede en primera instancia sintetizar la hebra complementaria sirviendo como molde para la producción de nuevas moléculas de ARN positivo, las cuales actúan como ARNs mensajeros para su posterior traducción a proteínas, o pueden servir como moldes para la síntesis del ARN negativo, o simplemente encapsidada dentro del virión ([Rice, 1996](#)). Las proteínas estructurales son translocadas y ancladas en el retículo endoplásmico (RE) mediante varias secuencias señal y dominios de anclaje a la membrana ([Mukhopadhyay, 2005](#)).

Ensamble y maduración

Inicialmente, las partículas inmaduras son formadas en lumen del RE. Esas partículas contienen a las proteínas E, prM, C y membrana lipídica. El ensamblaje del virión se inicia con la asociación del ARN positivo a la proteína C para luego formar la nucleocápside adquiriendo la envoltura del retículo endoplasmático. el virión no infeccioso formados por heterodímeros de las proteínas E y prM, una porción de la prM cubre a la E, previniendo una fusión prematura de los heterodímeros mientras atraviesan el medio ambiente ácido del trans- golgi. Finalmente la ruptura proteolítica de la prM, induce un cambio conformacional en la proteína E, haciendo madurar al virión y volviéndolo infeccioso. Las partículas subvirales también son producidas en el RE, pero sólo contienen a las proteínas E y prM, carecen de cápside y RNA+, haciendo de estas partículas no-infecciosas. El virus maduro y las partículas subvirales son liberados del hospedero por exocitosis ([Diamond, 2003](#); [Mukhopadhyay, 2005](#)).

2.7 Patogénesis

Se han emitido tres hipótesis para tratar de explicar la patogenia del dengue severo (DH/SCD)

Hipótesis basada en la virulencia de DENV

Postula que existen diferencias en virulencia entre los serotipos del virus dengue, es decir que mayor virulencia la probabilidad de desarrollar una enfermedad grave es mayor. Se ha reportado en algunos trabajos que el serotipo VDENV-2 es mucho más virulento entre los cuatro ([Pandey, 2000](#); [Anzai, 2004](#)). Existen algunas evidencias que proponen la circulación de cepas con mayor o menor potencial virulento. Un ejemplo es la cepa VDENV-2 (Genotipo Americano) que provocó la epidemia de Iquitos, Perú en 1995 en una población inmune a VDENV-1 y no se reportó un solo caso de DH ([Watts, 1999](#); [Kochel, 2002](#)). Estudios realizados encontraron diferencias

estructurales entre cepas de DEN-2 de origen asiático y americano que pueden tener influencia sobre la virulencia y/o la patogenicidad de estas cepas. Donde los determinantes principales de la severidad se encuentran en el aminoácido 390 de la proteína E que puede afectar la unión a la célula hospedera; los nucleótidos del 68 al 80 del lazo de la región 5' no codificadora, que podrían estar involucrados en la iniciación de la traducción; y en los primeros 300 nucleótidos de la región no codificadora 3', que pudieran participar en la regulación de la replicación viral ([Leitmeyer, 1999](#)). También se postuló que la virulencia de DENV está relacionada con la presencia de anticuerpos heterólogos que se forman en infecciones primarias, en las que generalmente no se desarrolla la forma severa de la enfermedad ([Halstead, 2009](#)). El riesgo de desarrollar dengue severo (DH/SCD) es mayor en la infección secuencial VDEN-1/VDEN-2, seguida de VDEN-3/VDEN-2 y no en otro orden ([Alvarez, 2006](#); [Guzman, 2002](#)). Sin embargo DH se puede desarrollar en infecciones primarias en adultos que no han sido expuestos con anterioridad a una infección por VD ([Ong, 2007](#)). Mediante diferentes técnicas de Biología Molecular se ha revelado que el virus dengue exhibe una extensiva diversidad genética ([Shu, 2009](#)) y que dentro de los mismos serotipos VDEN-2 y VDEN-3 algunos genotipos son más virulentos que otros. Un determinante de la variabilidad de la virulencia VD es la capacidad replicativa en macrófagos humanos in vitro ([Pryor, 2001](#)). Otra explicación para justificar tal variabilidad puede ser el hecho de que los virus más virulentos tengan tendencia a suprimir la activación de genes antivirales en el hospedero e inducir más muertes por apoptosis de monocitos humanos infectados en comparación con los virus menos virulentos, estos virus estimulan la secreción de factores virulentos como son: la IL-6, IL-8, las CCL5, factores inflamatorios y la producción de IFN ([Rababliert, 2007](#); [Ubol, 2008](#)).

Hipótesis de la potenciación mediada por anticuerpos (ADE)

La hipótesis postula que Los anticuerpos heterólogos formados durante la infección primaria, en concentraciones subneutralizantes son capaces de reconocer epítopes presentes en el virus que ocasiona la infección secundaria y pueden formar inmunocomplejos con el virus y facilitar la entrada a las células mononucleares. La infección se amplifica ya que los inmunocomplejos infecciosos pueden acceder con más facilidad a los receptores para Fc de los monocitos, fagocitos y células dendríticas maduras para facilitar la entrada viral y la replicación. Esto desencadena un elevado nivel de viremia y la activación de otras células del sistema inmune que consecuentemente aumentan la severidad de la enfermedad ([Boonnak, 2008](#); [Moi, 2010](#); [Jin, 2008](#)). Los mecanismos de acción de los anticuerpos potenciadores de la infección están poco esclarecidos; se conoce que actúan a bajas concentraciones. Se desconoce cómo las partículas de VDEN pueden escapar de la vía de degradación endocítica. Una posible explicación es el bajo número de anticuerpos unidos a la superficie del virión, de forma tal que la glicoproteína E libre puede hacer un reordenamiento para mediar la fusión con la membrana desde dentro del endosoma, dejando el virión libre para infectar la célula ([Van der Schaar, 2009](#)).

La importancia de la ADA en el desarrollo del dengue severo (DH/SCD) ha sido sustentada fundamentalmente por experiencias epidemiológicas ([Kliks, 1988](#); [1989](#); [Kouri, 1998](#)).

Hipótesis de los linfocitos T

Se postula que ante la infección primaria con un serotipo de los virus del dengue se genera un patrón linfocitario heterogéneo en el que se encuentran tanto los linfocitos T de memoria serotipo-específicos como los de reactividad cruzada. Ambos linfocitos juegan un papel importante en el desarrollo del dengue severo (DH/SCD) y en la inmunopatogénesis de la enfermedad ([Rothman, 1999; 2003](#)). Se ha observado que la respuesta es mayor contra el serotipo homólogo; sin embargo, después de una infección secundaria con uno de los virus del dengue los linfocitos T de memoria inducidos por la infección primaria muestran reactividad cruzada y proliferan rápidamente. Estas células T tienen poca avidéz y pueden causar efectos indeseados, producción de citoquinas inflamatorias cuyo exceso en la circulación parece ser el evento principal que lleva al aumento de la permeabilidad capilar; mientras que los linfocitos T de alta avidéz que normalmente son responsables del aclaramiento de las células infectadas por VDEN pueden estar preferencialmente reducidos ([Rothman, 2009; Basu, 2008; Dong, 2007](#)).

Una mayor destrucción de las plaquetas o una disminución en su producción pudieran ser la causa de la trombocitopenia. En este sentido, se ha detectado la presencia de complejos virus-anticuerpos en la superficie de las plaquetas de pacientes con DH, lo que sugiere que la respuesta inmune desempeña algún papel en la destrucción de las plaquetas. En este sentido, se ha encontrado la presencia de anticuerpos IgM de reactividad cruzada contra las plaquetas en los sueros de pacientes con DH que podrían causar lisis de estas y por tanto estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad ([Lin, 2001](#)).

Actualmente, la mayoría de los autores acepta que existe una vinculación de muchos factores de riesgo donde se involucran los dependientes del hospedero, el vector, el virus, los factores epidemiológicos y ecológicos. Sin embargo, desde 1987 ya había sido planteada por Kourí y colaboradores la denominada hipótesis integral ([Guzmán, 2008](#)). (Fig.3).

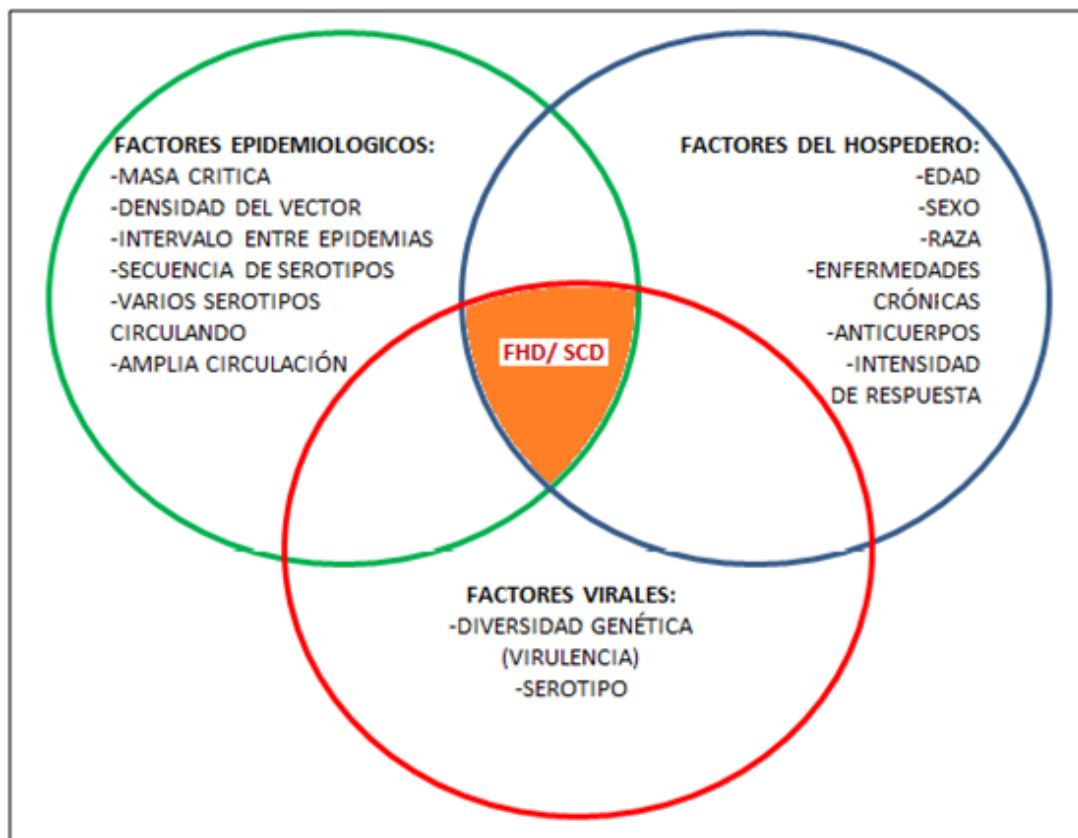


Figura 3. Hipótesis integral en la patogenia del Dengue Hemorrágico planteada por Kourí y colaboradores.

Dengue una sola enfermedad

La infección por dengue clínicamente puede ser de variada intensidad desde inaparente a causar una enfermedad grave. Luego de un período de incubación entre 5 a 7 días, podrán aparecer las manifestaciones clínicas.

Las infecciones sintomáticas pueden variar desde formas leves de la enfermedad, que solo se manifiestan con un cuadro febril agudo, de duración limitada (2 a 7 días); a otros cuya fiebre se asocia a intenso malestar general, cefalea, dolor retro ocular, dolor muscular y dolores articulares. Algunos casos de dengue pueden evolucionar a formas graves (dengue severo o grave) en las que hay manifestaciones hemorrágicas, pérdida de plasma (extravasación) debida al aumento de la permeabilidad vascular, (lo que ocasiona un incremento del hematocrito) y presencia de colecciones líquidas en cavidades serosas (derrame pleural, ascitis y derrame pericárdico), lo que puede llevar a un cuadro de shock.

Los casos de dengue grave son más frecuentes en personas que ya padecieron dengue por un serotipo (infección primaria) y se infectan nuevamente (infección secundaria) con un serotipo diferente al que le ocasionó el primer cuadro. Este fenómeno puede ocurrir incluso después de muchos años de ocurrida la infección primaria, sin embargo esto no significa que toda infección secundaria conduzca a dengue grave. La infección primaria puede asociarse a dengue grave, en relación a virulencia de la cepa o a otros factores del hospedero.

Las formas clínicas poco frecuentes se les llama “*atípicas*” y resultan de la afectación especialmente intensa de un órgano o sistema: encefalopatía, miocardiopatía o hepatopatía por dengue, encontrando también insuficiencia renal aguda asociada a mortalidad ([Martínez, 2005](#)).

Los grupos expertos de consenso en América Latina (Habana, Cuba, 2007), Asia Suroriental (Kuala Lumpur, Malasia, 2007), y en las oficinas principales de la Organización Mundial de la salud (OMS) en Ginebra, Suiza en 2008 acordaron que: “el dengue es una sola enfermedad con presentaciones

clínicas diferentes y a menudo con evolución clínica y resultados impredecibles”.

La OMS auspició un estudio internacional, llamado DENCO (Dengue Control), cuyo objetivo principal fue encontrar una forma mejor de clasificar la enfermedad e identificar los signos de alarma útiles para mejorar el manejo de casos de dengue. Como resultado de este estudio se arribó a la propuesta de una clasificación binaria de la enfermedad: dengue y dengue severo o grave.

Los criterios de dengue severo fueron los siguientes: a) Extravasación severa de plasma, expresada en Choque hipovolémico, y/o por dificultad respiratoria debida al exceso de líquidos acumulado en el pulmón. b) Hemorragias severas, según criterio del médico tratante, y c) la afectación de órganos: hepatitis severa por dengue (transaminasas superiores a 1000 unidades), encefalitis por dengue o la afectación grave de otros órganos, como la miocarditis por dengue. Estos criterios de severidad tuvieron 95% de sensibilidad y 97% de especificidad ([Jaenisch, 2008](#); [Martinez, 2008](#)).

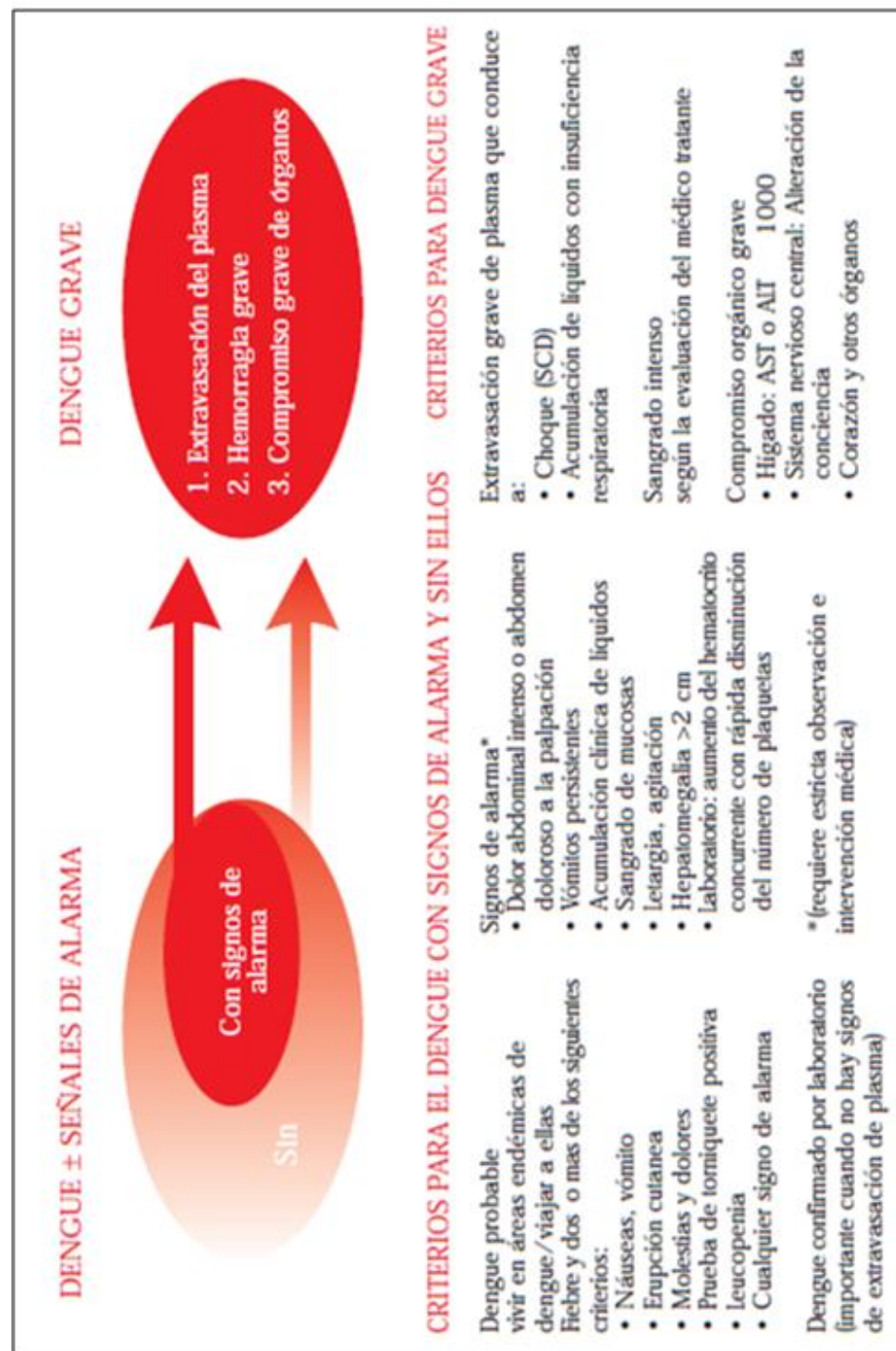


Figura 4. Clasificación de la enfermedad por Dengue.

Fuente: Tomado de Dengue guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, OMS2009

2.8 Diagnóstico de Laboratorio

Para confirmar una infección por dengue debe aislarse y caracterizarse el virus, detectarse su genoma o confirmar la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente. Para ello una correcta toma de muestra es necesaria en la fase aguda de la enfermedad, etapa febril (2 -7 días), así aseguramos la presencia del virus en suero, plasma o tejido; y para estudios serológicos una muestra convaleciente tomada 2-3 semanas post-infección ([Guzman, 1996](#)).

Aislamiento viral

Se pueden utilizar cuatro sistemas para lograr el aislamiento del virus 1) Inoculación intracerebral en ratones. 2) Uso de líneas celulares de mamíferos, 3) Inoculación intratorácica en mosquitos adultos, o 4) el uso cultivo celular de mosquitos, esta última en la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* que es la técnica más usada porque se pueden procesar varias muestras con bajo costo y alta sensibilidad. Finalmente para la identificación viral, la técnica de inmunofluorescencia es la más usada y utiliza anticuerpos monoclonales serotipo-específico ([Gubler, 1987, 1998](#); [Cabezas, 2005](#)).

Diagnóstico molecular

Se puede utilizar las técnicas de RT-PCR en un paso, nested-PCR o RT-PCR en tiempo real, para amplificar el genoma de ARN del virus presente en las muestras a analizar (sueros, tejidos, mosquitos), estas técnicas proveen un diagnóstico rápido, sensible y simple y han reemplazando progresivamente a las técnicas de aislamiento viral debido además por sus bajos costos ([Shu, 2004](#)).

Diagnostico serológico

Cinco test han sido desarrollados para lograr un diagnostico serológico, en estos casos la confirmación del diagnóstico se da cuando hay un incremento de cuatro veces el título de anticuerpos entre la muestra de la fase aguda y convaleciente, entre ellos tenemos: 1) Inhibición de la hemaglutinación, 2) Fijación del complemento 3) Test de neutralización 4) Elisa de captura IgM (MAC-ELISA) 5) Elisa para IgG.

Detección del antígeno viral

Mediante la inmunohistoquímica o inmunofluorescencia realizada en tejidos de necropsias o en muestras séricas por ensayos inmunoenzimáticos (EIA).

2.9 Variabilidad Genética del Virus Dengue

Los virus de ARN se replican con una alta tasa de error, debido a que su ARN polimerasa carece de actividad correctora o verificadora, y se organizan en poblaciones de alta diversidad genética denominadas cuasi especies ([Domingo, 2002](#); [Wang, 2002](#)). Estas características le confieren a estos virus una gran capacidad de adaptación a los cambios en las presiones selectivas. Basado en los datos moleculares, se determinó la gran diversidad genética entre los virus dengue. Los factores que contribuyen a esta son: mutación, recombinación, flujo genético, susceptibilidad del hospedero, reservorio primate y probablemente población; siendo las implicancias epidemiológicas derivada de esta diversidad, la emergencia de virus con mayor rango de propiedades patogénicas y aparición de cepas con incremento en la transmisibilidad (alta viremia) y virulencia ([Holmes, 2000](#)).

Se ha comprobado la recombinación entre cepas de VDEN, posiblemente debido a la circulación simultánea de genotipos diferentes de un serotipo en el hospedero ([Twiddy, 2003](#)).

2.10 Genotipos De Dengue 2

En el virus Dengue existe una variabilidad genética manifestada por la existencia de cuatro serotipos antigénicamente diferentes expuestos anteriormente. El análisis comparativo de secuencias de genes permitió estudiar la estructura genética de los virus del dengue en diferentes poblaciones. El análisis de 240 pares de bases (pb) correspondientes a la región de unión de los genes de la envoltura y la no estructural 1 (E/NS1), demostraron la variación intra-serotípica. Mediante dicho análisis, se estableció la existencia de “genotipos” para los VDEN-1 y VDEN-2, definidos arbitrariamente como “un grupo de virus del dengue que tenían menos de un 6% de divergencia en sus secuencias nucleotídicas” ([Rico-Hesse, 1990](#)).

Actualmente los estudios de diversidad genética se han expandido hasta usar el genoma completo, aunque la mayoría de los autores utilizan la secuencia del gen E (aprox.1485bp) para estudios filogenéticos. El DENV-2 es uno de los virus más estudiados, la variación genética frecuentemente difiere de acuerdo con la distribución geográfica. Twiddy y colaboradores, describieron 5 genotipos mediante el análisis del gen E: Selvático, Cosmopolita, Asiático 1, Asiático 2, Americano y Asiático/Americano ([Twiddy, 2002](#)). En particular, dos de los genotipos de DEN-2 se encuentran únicamente en poblaciones Asiáticas (Asiático 1 y Asiático 2), mientras que el genotipo denominado Cosmopolita se distribuye prácticamente por todo el mundo Tropical. Este genotipo que alberga virus tomados de localizaciones geográficas muy diferentes, nos muestra cuán lejos un organismo infectado y el vector pueden propagar el virus ([Holmes, 2003](#)).

CAPÍTULO 3: METODOLOGIA

3.1 Aislamiento Viral

Para el aislamiento viral se aplicó el método de centrifugación rápida utilizando una línea celular de *Aedes albopictus* (C6/36). Estas células fueron propagadas en placas plásticas de 24 pozos, a 33°C, en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor a 56°C por una hora (STFI), 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de una solución de glutamina 200mM. Cuando se alcanzó la confluencia de las monocapas celulares, se retiró el medio de cultivo y se inocularon las muestras correspondientes.

Se utilizaron muestras de suero de pacientes febriles colectados de diferentes regiones del Perú. Se utilizaron 100ul de cada suero previamente diluido (1/10) en medio de mantenimiento (E-MEM, 2% FBS, 1% antibiótico y antimicótico). Una vez añadido el inóculo correspondiente por duplicado, la placa fue centrifugada a 1000 g por 30 minutos a 33°C e incubada por 1 hora a la misma temperatura y con 5% CO₂, para después agregarle 1ml de medio de mantenimiento a cada pozo. Las células inoculadas se mantuvieron a las mismas condiciones de temperatura y CO₂ y se observaron diariamente en búsqueda de efecto citopático (ECP). Si se observa ECP o en caso contrario al cabo de 10 días de inoculadas, las células fueron fijadas para detección de antígeno de dengue mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando líquido ascítico hiperinmune anti-dengue. En los casos positivos se realizó una segunda IFI con el objetivo de realizar la tipificación utilizando anticuerpos monoclonales específicos para cada uno de los cuatro serotipos del dengue.

3.2 Aislamientos de Dengue 2 Estudiados

Se seleccionaron 30 aislamientos obtenidos en la Unidad de investigación de enfermedades tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6) de sueros provenientes de diferentes departamentos del Perú como Tumbes, Piura, Loreto, Madre de Dios. El criterio de selección de las muestras fue al azar por año de aislamiento y por lugar, abarcando un periodo de 10 años de circulación del dengue 2 en nuestro país (2000-2010) (ver tabla 1). En los 30 aislamientos se estudió el gen que codifica para la proteína de la envoltura (E) del virus.

Tabla 1. Relación de los aislamientos estudiados

CEPA	AÑO	LUGAR
OBS9638	2000	PIURA-PERÚ
OBS9610	2000	PIURA-PERÚ
OBT1088	2000	PIURA-PERÚ
OBT 1243	2000	PIURA-PERÚ
FSP011	2000	TUMBES-PERÚ
OBT1917	2001	PIURA-PERÚ
OBT1950	2001	PIURA-PERÚ
FSL699	2002	LORETO-PERÚ
NFI052	2002	LORETO-PERÚ
IQD2227	2002	LORETO-PERÚ
IQD2856	2002	LORETO-PERÚ
IQD2005	2002	LORETO-PERÚ
IQD2979	2002	LORETO-PERÚ
FMD1346	2007	MADRE DE DIOS-PERÚ
FMD1258	2007	MADRE DE DIOS-PERÚ
FMD1337	2007	MADRE DE DIOS-PERÚ
FMD2210	2008	MADRE DE DIOS-PERÚ
FMD2276	2009	MADRE DE DIOS-PERÚ
FMD2285	2009	MADRE DE DIOS-PERÚ
FMD2303	2009	MADRE DE DIOS-PERÚ
FMD2311	2009	MADRE DE DIOS-PERÚ
FPI337	2010	LORETO-PERÚ
FPI1063	2010	LORETO-PERÚ
FSL4823	2010	LORETO-PERÚ
FSL4874	2010	LORETO-PERÚ
NFI1166	2010	LORETO-PERÚ
NFI1159	2010	LORETO-PERÚ
FPY019	2010	LORETO-PERÚ
FPY016	2010	LORETO-PERÚ
ASA 858	2010	LORETO-PERÚ

3.3 Extracción de ARN

El ARN fue extraído usando el QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen), de la siguiente manera; se tomó 140 µl del cultivo celular en un tubo de microcentrifuga de 1.5ml conteniendo 560 µl del buffer AVL, se mezcló con ayuda de un vortex por 10 segundos, se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos, se añadió 560 µl de etanol absoluto grado molecular (Sigma) y mezcló nuevamente con un vortex por 10 segundos. Se adicionó 630 µl de la mezcla en la columna QIAamp Mini spin, contenida en un tubo colector de 2 ml, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, se cambió el tubo de colección por uno nuevo y se descartó primer tubo que contenía el filtrado, se adicionó los 630 µl restantes y se repitió el procedimiento anteriormente descrito, seguidamente se añadió 500 µl del buffer AW1 y se centrifugó a 8,000 rpm por un minuto, descartando el filtrado. Se añadió 500 µl del buffer AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos; se eliminó nuevamente el filtrado, se adicionó finalmente 60 µl del buffer AVE a la columna, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, se recuperó el filtrado y almacenó a -20 °C.

3.4 Identificación del Virus Dengue 2 mediante Técnicas Moleculares

La confirmación de los aislamientos se realizó usando un protocolo descrito previamente ([Lanciotti, 1992](#)) conservando los cebadores publicados, pero con ligeras modificaciones en las condiciones de termociclado. Este protocolo consta de dos etapas: RT-PCR, Seminested múltiple PCR y el análisis de los productos mediante electroforesis.

RT-PCR

Se generó cDNA y amplificó un producto a partir del ARN viral extraído usando el siguiente protocolo: a un tubo de 2.0ml se adicionó 10ul del Buffer de PCR 5X (Promega), 4 µl de una mezcla de dNTP (2.5mM) (Promega), 1.25 µl de los cebadores(10uM) específicos para dengue ([Lanciotti, 1992](#)), 0.25ul de ditionitroto (DTT) (Promega), 0.2ul de transcriptasa reversa Avian Myeloblastosis Virus (AMV) de 10U/ul (Promega), 0.3ul de la enzima polimerasa GoTaq® de 5U/ul (Promega), 5 µl del ARN viral extraído y agua libre de nucleasas (Gibco) cantidad suficiente para 50µl por reacción; se incubó a 45 °C por 60 minutos para permitir la síntesis del cDNA, después a 95°C durante 3 min para inactivar la transcriptasa reversa; luego se continuó con un periodo de 35 ciclos con temperaturas de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto; y una extensión final de 72°C por 5 minutos para asegurar la síntesis completa de la doble hebra de DNA. Se incluyó como controles positivos ARN extraídos de cultivos en la línea celular C636 de los cuatro serotipos de dengue y tres controles negativos, un control negativo de extracción, control de la mezcla maestra y por último un control negativo que contiene un virus diferente.

Seminested Múltiple PCR

Subproductos de diversos tamaños fueron amplificados a partir del amplicon del RT-PCR usando cebadores específicos para cada serotipo de dengue al mismo tiempo. El protocolo fue el siguiente: a un tubo de 2.0ml se adicionó 10ul del Buffer de PCR 5X (Promega), 4 µl de una mezcla de dNTP (2.5mM) (Promega), 1.25 µl de los cebadores específicos (10uM) para cada serotipo de dengue (Lanciotti, 1992), 0.3ul de la enzima polimerasa Go®Taq (5U/ul) (Promega), 5 µl de una dilución 1:100 del producto de RT-PCR y agua libre de nucleasas cantidad suficiente para 50µl por reacción; se incubó a 95°C durante 3 min, luego se continuó con un periodo de 14 ciclos con temperaturas de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto.

Electroforesis

Se mezclaron 8ul del producto del Seminested múltiple PCR con 4ul de buffer de corrida; la mezcla se corrió en un gel de agarosa al 2 % a 110 voltios por 60 minutos utilizando un marcador de peso molecular de 100pb. El gel se reveló en bromuro de etidio y fue leído en un transiluminador de luz ultravioleta computarizado, GEL DOC (Biorad).

3.5 Amplificación y Secuenciación Nucleotídica del Gen de la Envoltura de los Aislamientos Peruanos Obtenidos

Diseño de cebadores

Se escogieron 3 secuencias de la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) conocida como el GenBank. Se seleccionaron dos genotipos del AM/AS, Jamaica con número de acceso M20558 y MARA 3 con número de acceso AY044442; y un genotipo americano IQT2913 con número de acceso AF100468. La secuencia consenso fue obtenida mediante el software BioEdit y el diseño de los cebadores fue obtenido mediante el software Primer Express 2.0. Se escogieron 4 cebadores, utilizando los siguientes criterios: la máxima coincidencia de pares de bases con las tres secuencias, no menor del 40% de contenido de guanina y citosina (GC), no más de 25 pares de bases, temperatura de alineamiento o de fusión (T_m) similares entre los cebadores no menor de 50°C y que no exista complementariedad entre los cebadores. Fueron seleccionados 2 cebadores para el RT-PCR y secuenciamiento y dos más para el secuenciamiento (ver tabla 2)

Tabla 2. Cebadores diseñados en la presente tesis

Cebadores	Secuencias (5'→3')	Ensayo
DEN2-913 (+)	CCAGGCTTTACCATAATGGC	RT-PCR y Secuenciamiento
DEN2-2604 (-)	CCAGCTGCACAACGCAACCAC	RT-PCR y Secuenciamiento
DEN2-1606 (+)	GCGGACACACAAGGATCA	Secuenciamiento
DEN2-1752 (-)	CATCTGGATTTCTGTGGCC	Secuenciamiento

RT-PCR

Se generó una hebra complementaria al RNA (cDNA) y amplifico un producto a partir del ARN viral extraído usando el siguiente protocolo: a un tubo de 2.0ml se adicionó 10ul del Buffer de PCR 5X (Promega), 4 µl de una mezcla de dNTP (2.5mM) (Promega), 5µl de los cebadores (10uM) específicos para la región de la envoltura del dengue 2 (tabla 2), 0.25ul de ditioneitol (DTT) (Promega), 0.3ul de transcriptasa reversa AMV de 10U/ul (Promega), 0.5ul de la enzima polimerasa Go®Taq de 5U/ul (Promega), 10 µl del ARN viral extraído y agua libre de nucleasas (Gibco) cantidad suficiente para 50µl por reacción; se incubó a 45 °C por 60 minutos para permitir la síntesis del cDNA, después a 95°C durante 3 min para inactivar la transcriptasa reversa; luego se continuó con un periodo de 38 ciclos con temperaturas de 94°C por un minuto, 55°C por un minuto y 72°C por tres minutos; y una extensión final de 72°C por 10 minutos para asegurar la síntesis completa de la doble hebra de DNA. Se incluyó como control positivo un DENV-2 de la variedad americana y tres controles negativos, un control negativo de extracción, control de la mezcla maestra y por último un control negativo que contiene un virus diferente. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis.

Purificación y Secuenciamiento

Los productos de PCR fueron purificados mediante columnas CENTRI-SEP® (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de secuenciación se utilizaron; kit BigDye® Terminator (Applied Biosystems), producto purificado y cuatro cebadores (dos del RT-PCR y dos internos) (tabla 2). Se prepararon 4 mezclas por producto de PCR (muestra); una mezcla para cada cebador conteniendo 4-8 µL del producto de PCR purificado, 1 pmol del cebador correspondiente, 4 µL de buffer 5X, 4 µL de la mezcla terminadora que contenía los cuatro dideoxinucleótidos marcados y agua libre de nucleasas en cantidad suficientes para 20 µL. La reacción transcurrió con las siguientes condiciones: 96°C por 1 min. y 25 ciclos a 96°C (10 s), 50°C (10 s) y 60°C (4 min.). Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados mediante columnas CENTRI-SEP®

(Applied Biosystems). Posteriormente fueron secados mediante centrifugación al vacío y resuspendidos en formamida para la corrida en el secuenciador.

3.6 Análisis Filogenético de las Secuenciadas obtenidas del Gene de la envoltura

Preparación de la información obtenida con el secuenciador

Las secuencias consensos fueron obtenidas utilizando el software Sequencher 4.0 (Applied Biosystems). La información obtenida para cada cebador fue analizada en su calidad de secuencia y corrección de nucleótido si fue necesario. Luego ensamblamos las cuatro secuencias por muestra obtenidas por cada cebador y comparamos verificando las coincidencias en las bases obtenidas.

Las 30 secuencias consenso se compararon con secuencias escogidas al azar de países vecinos entre los años 2000-2010 y secuencias representativas de cada uno de los cinco genotipos que causan enfermedad en humanos. Con el objetivo de generar un árbol enraizado se incluyó además secuencias del genotipo selvático encontrado solo en mosquitos. Las secuencias publicadas fueron obtenidas de la base de datos del GenBank (NCBI) (ver tabla 3) y la alineación con las obtenidas en la presente tesis fue realizada con CLUSTAL W dentro del software BIOEDIT, obteniéndose un archivo con extensión fasta. Para el análisis filogenético se utilizó el software MEGA 5.0.

Tabla 3. Relación de las secuencias obtenidas del Gen Bank.

GENBANK	CEPA	AÑO	LUGAR	GENOTIPO
FJ850072	BID-V2376/2000	2000	BRAZIL	AMERICANO/ASIÁTICO
FJ850074	BID-V2379/2001	2001	BRAZIL	
FJ850076	BID-V2382/2002	2002	BRAZIL	
FJ850078	BID-V2386/2003	2003	BRAZIL	
FJ850082	BID-V2390/2004	2004	BRAZIL	
FJ850085	BID-V2393/2005	2005	BRAZIL	
FJ850088	BID-V2396/2006	2006	BRAZIL	
FJ850091	BID-V2399/2007	2007	BRAZIL	
HM181971	BID-V3637/2008	2008	BRAZIL	
HQ012529	BR0066/BA/2009	2009	BRAZIL	
HQ012531	BR0023/RJ/2010	2010	BRAZIL	
FJ898466	BID-V2942/2000	2000	VENEZUELA	
JN819408	BID-V2161/2001	2001	VENEZUELA	
FJ639734	BID-V2160/2003	2003	VENEZUELA	
FJ850112	BID-V2424/2004	2004	VENEZUELA	
FJ898467	BID-V2944/2005	2005	VENEZUELA	
FJ639822	BID-V2262/2006	2006	VENEZUELA	
GQ868641	BID-V1144/2007	2007	VENEZUELA	
FJ850106	BID-V2476/2008	2008	VENEZUELA	
GQ868554	BID-V3370/2004	2004	COLOMBIA	
FJ182012	BID-V1597/2005	2005	COLOMBIA	
GU131947	BID-V3374/2007	2007	COLOMBIA	
EU045311	D2PY-04/01	2001	PARAGUAY	
EU045312	D2PY-21/05	2005	PARAGUAY	
EU045313	D2PY-22/05	2005	PARAGUAY	
AY484649	EC2000A	2000	ECUADOR	
AY484651	EC2000B	2000	ECUADOR	
AY484611	CDC337325_BOL1997	1997	BOLIVIA	
X54319	TONGA 74	19974	TONGA	AMERICAN
DQ917242	IQT 1950	1995	LORETO-PER'U	
AF038403	NEW GUINEA C 44	1944	NEVA GUINEA	ASIA TYPE 2
AF204178	43	1987	CHINA	
AF204177	44	1989	CHINA	
DQ181806	16803	1974	TAILANDIA	ASIA TYPE 1
M84727	16681	1979	TAILANDIA	
AF195033	D84-016	1980	TAILANDIA	
X15434	M1	1987	MALASIA	
AF231717	P8 1047 70	1970	MALASIA	SYLVATIC
AF231718	DAKAr578 80	1980	COSTA DE IVORY	
AF231719	PM33974 81	1981	GUINEA	
AF231720	DAKHD10674	1970	SENEGAL	

Análisis filogenético

Primero se identificó el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado utilizando la opción de model test en MEGA 5.0. Luego se elaboró 3 árboles filogenéticos utilizando los métodos Neighbor Joining (NJ), Maximun Likelihood (ML) y Parsimonia (P). Además se incluyó el análisis de bootstrap con 1000 réplicas para determinar la robustez del árbol formado para cada método, con el fin de obtener una confianza y realizar el análisis de los resultados basados en los clados formados con valores ≥ 70 .

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento, RT-PCR y Secuenciamiento

En el presente estudio se determinaron las secuencias nucleotídicas del gen E de 30 aislamientos de DENV-2 obtenidos en brotes ocurridos en diferentes departamentos del Perú (Tumbes, Piura, Loreto, Madre de Dios durante los años 2000 al 2010.

Todos los aislamientos fueron positivos para dengue usando anticuerpos policlonales y específicamente para VDENV-2 usando anticuerpos monoclonales.

Todas las muestras fueron identificadas por PCR como VDENV-2, dando una banda nítida única del mismo tamaño (123pb) que el control positivo, verificando además la pureza del aislamiento. (ver Fig. 5).

Respecto al RT-PCR desarrollado con los cebadores diseñados, todas las muestras dieron una banda correspondiente con la banda positiva dando un producto de 1692 pares de bases. Adicionalmente se probaron en PCR los cebadores internos diseñados para el secuenciamiento obteniéndose bandas del tamaño esperado (859pb y 1018pb) (ver Fig. 6).

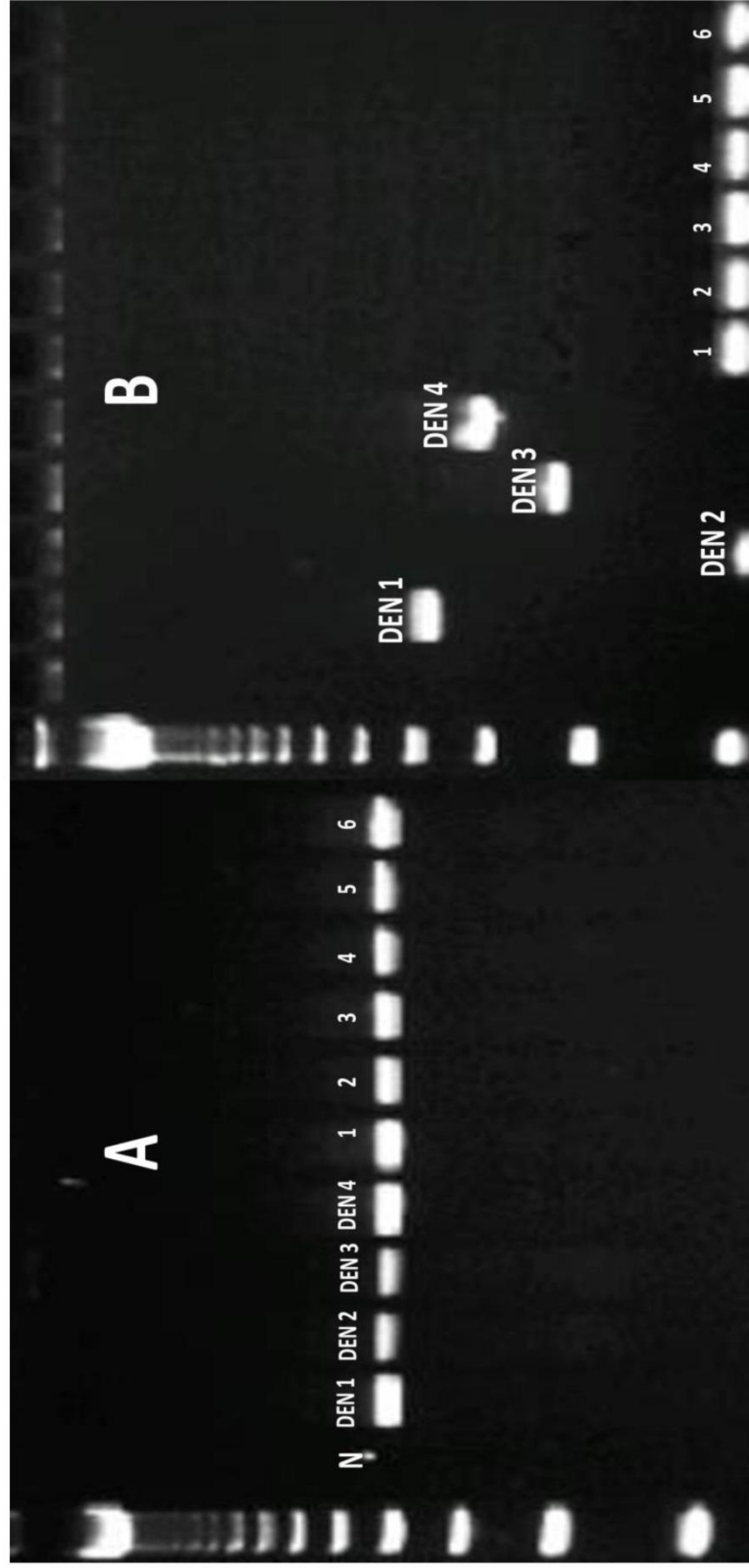


Figura 5 .Electroforesis mostrando resultados positivos para Dengue 2 mediante la técnica de Lanciotti usada para la confirmación molecular de los aislamientos positivos. A. RT-PCR y B. Nested PCR.
 Leyenda: N: negativo; DEN1-DEN4: controles positivos de los cuatro serotipos de Dengue; 1 – 6: muestras obtenidas de aislamiento viral.

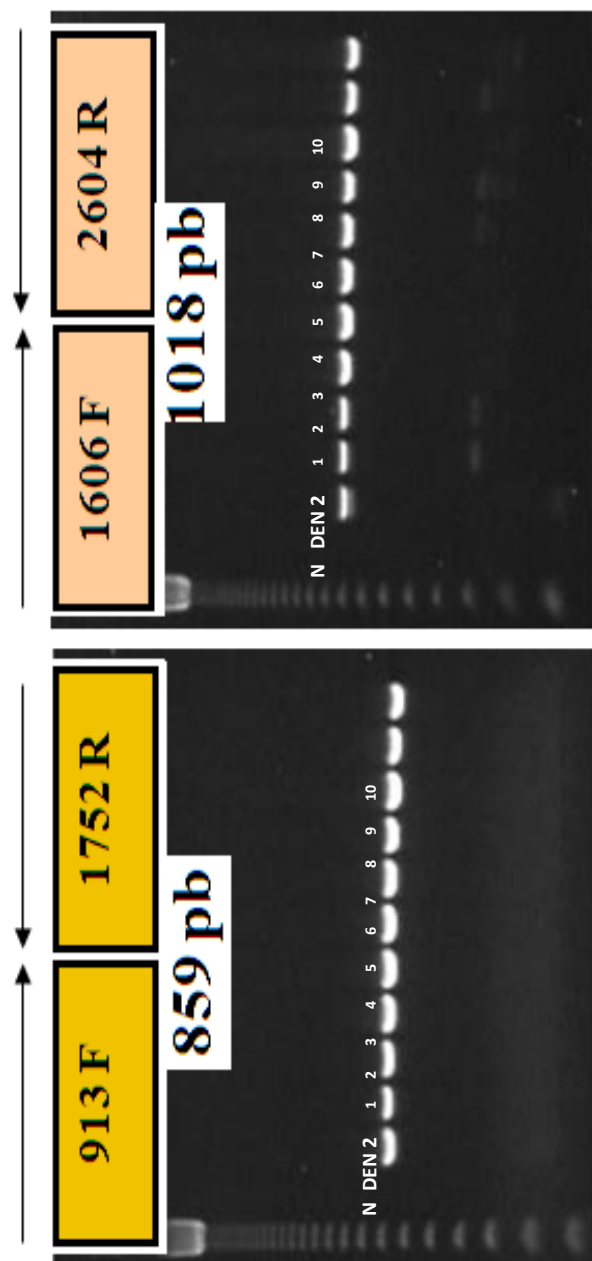


Figura 6 .Electroforesis mostrando resultados de RT - PCR usando los 4 cebadores diseñados para la amplificación y secuenciación del gen de la envoltura.

Abreviación.

Leyenda: N: negativo; DEN2: control positivo de Dengue 2; 1 – 10: muestras obtenidas de aislamiento viral.

Las secuencias de los productos purificados fueron legibles en las cuatro lecturas obtenidas con cada cebador, verificando que la reacción BigDye se dio adecuadamente y que los cebadores funcionaron bien y la purificación del producto fue satisfactoria.

Luego de determinar la secuencia consenso para cada muestra y verificar que la misma traduzca en aminoácidos sin la presencia de codones stop; las 30 secuencias consenso fueron identificadas como VDEN-2 mediante la comparación con las secuencias de la base de datos del GenBank usando la búsqueda por BLASTn.

4.2 Análisis de la comparación nucleotídica del gen E

Las cepas aisladas en Perú fueron comparadas con cepas representantes pertenecientes al genotipo Americano (cepa TONGA 74) y al genotipo Asiático/Americano (cepa JAMAICA 83). Dando como resultado que el valor más alto fue para la cepa OBS 9638 aislada en Piura con 100% de homología en amino ácidos con respecto a TONGA 74 y para las cepas aisladas en Madre de Dios 2007 con 99.5% de homología en amino ácidos con respecto a JAMAICA 83. (ver tabla 4). A este nivel se puede diferenciar dos genotipos circulando en Perú la variedad Americana y la Asiática.

Tabla 4. Resultado de la comparación nucleotídica y aminoacídica entre las cepas peruanas con las cepas representativas del genotipo Americano (Tonga 74) y el genotipo Americano/Asiático (Jamaica 83).
Abreviación: NT: Nucleotidos; AA: aminoácidos.

SUBTIPO	LUGAR	TONGA 74		JAMAICA 83	
		NT	AA	NT	AA
AMERICANO	PIURA 2000	97.7	100	90.8	97.8
AMERICANO/ASIATICO	PIURA 2000	90.5	97.4	97.9	98.8
	PIURA -TUMBES 2001	90.7	97.5	97.8	98.9
	LORETO 2002	90.9	97.3	98.7	99.1
	MADRE DE DIOS 2007	90.8	97.7	98.4	99.5
	MADRE DE DIOS 2008	90.7	97.5	98.2	99.3
	MADRE DE DIOS 2009-1	90.7	97.5	98.2	99.3
	MADRE DE DIOS 2009-2	90.6	97.7	97.5	98.7
	LORETO 2010	90.5	97.7	97.3	98.7

4.3 Análisis filogenético de la secuencia nucleotídica del gen E

Antes de realizar el análisis filogenético con las secuencias obtenidas en este estudio y las publicadas en el GenBank, se calculó el mejor modelo de sustitución nucleotídica que se aplicaría a nuestra base de datos. Antes del análisis se seleccionó solo una por cada grupo de secuencias que presentaban la misma información. El mejor modelo de sustitución nucleotídica se halló con la opción model test incluida en el software MEGA 5.0 tomando como criterio de elección el menor valor de criterio de inferencia bayesiana (BIC) (tabla 5).

El resultado fue que Tamura-Nei con un parámetro de invariantes $I=0.609$ (TN93+I) fue el mejor modelo que se ajusta a nuestros datos por que presenta el menor valor BIC y como opcional al TN93 + G con un parámetro de forma de valor $G=0.27$. Dentro de las opciones que presentó el MEGA 5.0 no permitió escoger a TN93+I ni TN93 G+I en la construcción del árbol usando el método Neighbor Joining, por lo que se optó por usar el modelo TN93+G, pero si fue posible usar el mejor modelo con el método de Máxima verosimilitud o Maximun Likelihood. El método de parsimonia no contempla el uso de estos modelos.

Tabla 5. Resultado de la prueba para encontrar el mejor modelo de sustitución nucleotídica utilizando el model test opción incluida en el MEGA 5.0. Abreviación: GTR: General Time Reversible; HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor.

Model	#Param	BIC	AICc	lnL	Invariant	Gamma	R
TN93+I	127	15295	14098	-6921.7	0.609327	n/a	7.2383
TN93+G+I	128	15298	14091	-6917.4	0.578101	4.14165	7.3356
TN93+G	127	15307	14110	-6927.6	n/a	0.27039	7.2312
GTR+I	130	15312	14087	-6913.2	0.609633	n/a	7.1748
GTR+G	130	15326	14100	-6920	n/a	0.26999	7.195
GTR+G+I	131	15337	14102	-6920	0	0.26999	7.195
T92+G	124	15359	14189	-6970.6	n/a	0.26433	7.0784
T92+G+I	125	15363	14184	-6967.1	0.553217	2.20355	7.0731
T92+I	124	15369	14200	-6975.8	0.61595	n/a	6.8678
K2+G	123	15369	14210	-6981.7	n/a	0.26375	7.0662
K2+G+I	124	15374	14205	-6978.5	0.550437	2.08991	7.0675
HKY+G	126	15379	14191	-6969.2	n/a	0.25237	7.6867
K2+I	123	15381	14222	-6987.7	0.617219	n/a	6.8688
HKY+G+I	127	15385	14188	-6966.7	0.538958	1.6752	7.6811
HKY+I	126	15399	14211	-6979.5	0.618998	n/a	7.2381
TN93	126	15866	14678	-7212.8	n/a	n/a	5.3948
GTR	129	15886	14670	-7205.8	n/a	n/a	5.3891
T92	123	15928	14769	-7261.2	n/a	n/a	5.3775
K2	122	15941	14791	-7273.4	n/a	n/a	5.3801
HKY	125	15990	14812	-7280.9	n/a	n/a	5.371
JC+G	122	16484	15334	-7544.6	n/a	0.3253	0.5
JC+G+I	123	16489	15329	-7541.5	0.533157	2.84208	0.5
JC+I	122	16786	15636	-7695.9	0.203799	n/a	0.5
JC	121	16962	15821	-7789.5	n/a	n/a	0.5

Varios análisis filogenéticos en diferentes países latinos fueron hechos en base a la región parcial conjunta de envoltura con la no estructural 1 (E/NS1) y en base al gen parcial o total de la envoltura, generalmente utilizando un solo método (Mendez, 2012; Oliveira, 2010; Romano, 2010; Uzcategui, 2001). En la presente tesis se optó por analizar con los tres métodos más usados: el de distancia (NJ), el de máxima verosimilitud (ML) y el método de parsimonia (MP), obteniéndose básicamente los mismos resultados, demostrándose de esta forma la robustez de los clados descritos anteriormente. Además, se optó por incluir cepas circulantes de los países sud-americanos durante el mismo periodo (2000-2010) asegurándose de tener un muestreo representativo con la finalidad de entender la relación con las cepas peruanas.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen E obtenidas junto con una selección de las secuencias de dicho gen, disponibles en la base de datos GenBank, seguido de los análisis por tres métodos distintos. Los tres métodos de análisis dieron prácticamente resultados similares, logrando determinar dos etapas en la historia del VDEN-2 en Perú. La primera desde 1990 hasta el 2000 donde se aislaron cepas de VDEN-2 del genotipo Americano y del 2000 al 2010 donde los aislamientos se agruparon dentro del genotipo Americano/Asiático previamente definido por Twiddy y colaboradores, esto confirma lo previamente observado en el análisis de la comparación nucleotídica (ver figuras. 7, 8 y 9)

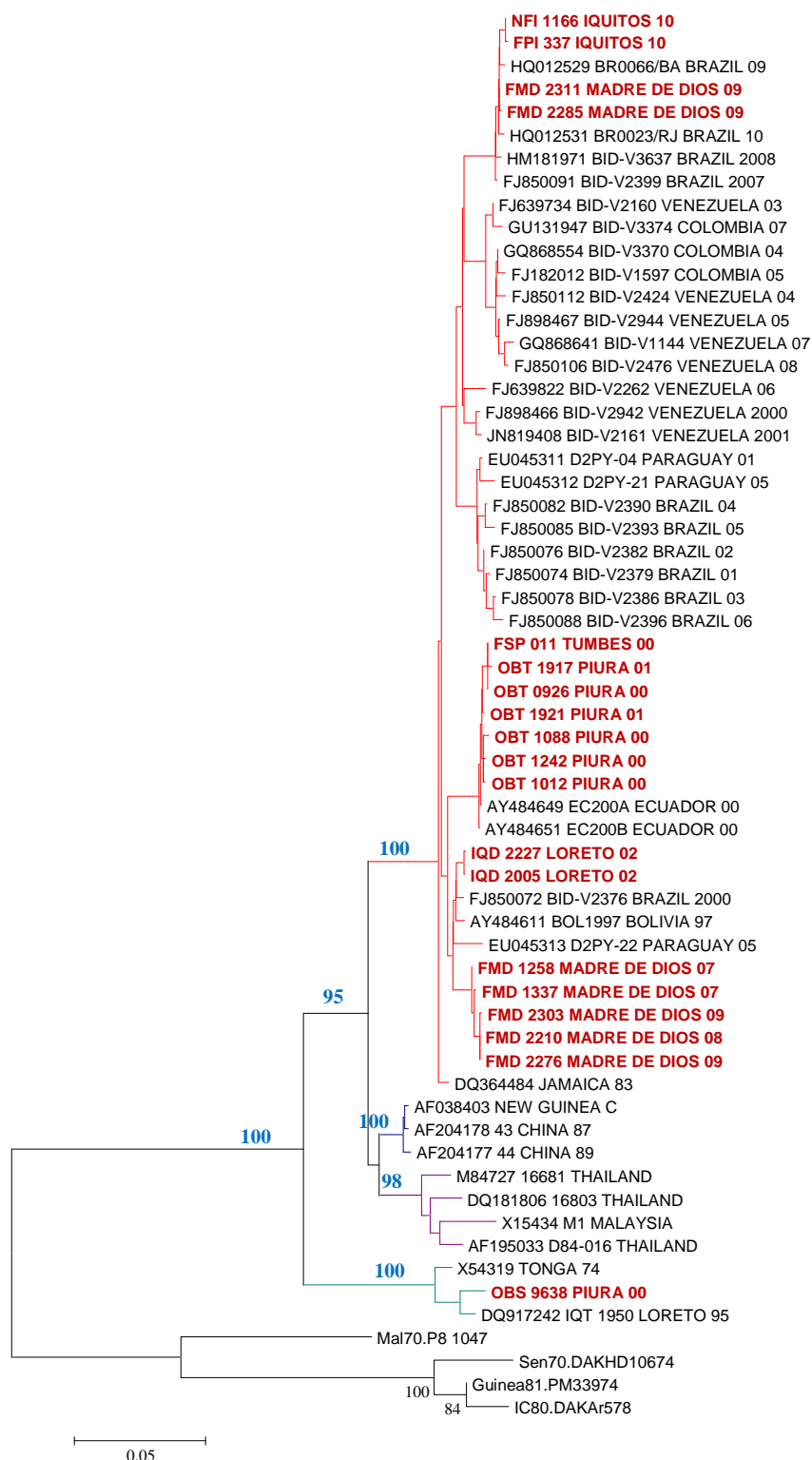


Figura 7. A) Árbol filogenético utilizando el método de Neighbour Joining. La distancia evolutiva fue calculada con el modelo Tamura-nei. Los valores de confianza fueron determinados usando 1000 replicaciones de Bootstrap. Solo se muestra los valores de Bootstrap ≥ 70 en cada genotipo.

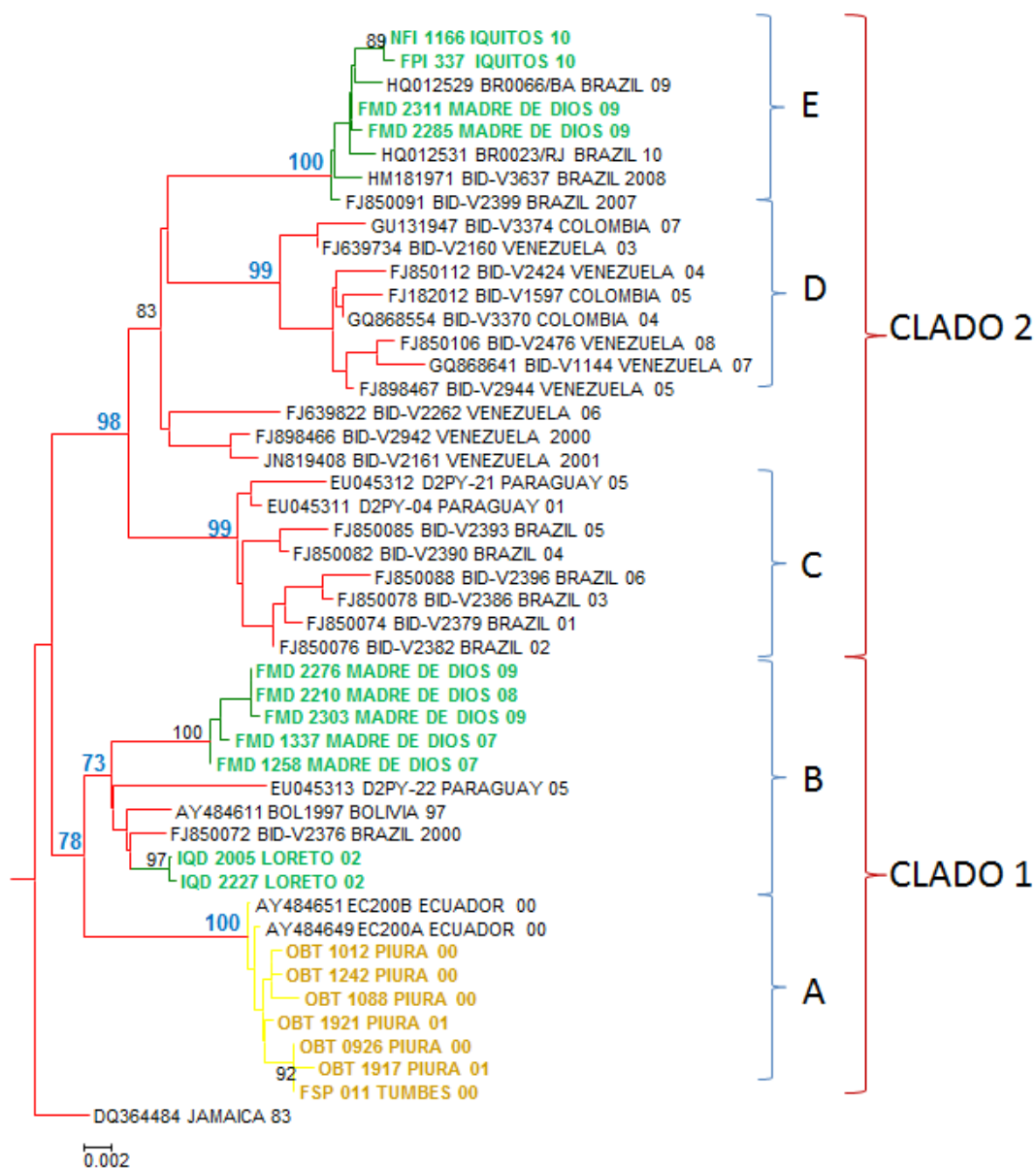


Figura 7. B) Rama del genotipo Americano/Asiático mostrando los diferentes clados (1 y 2) y sub-clados (A, B, C, D y E). Solo se muestran los valores de bootstrap importantes (≥ 70) para el análisis.

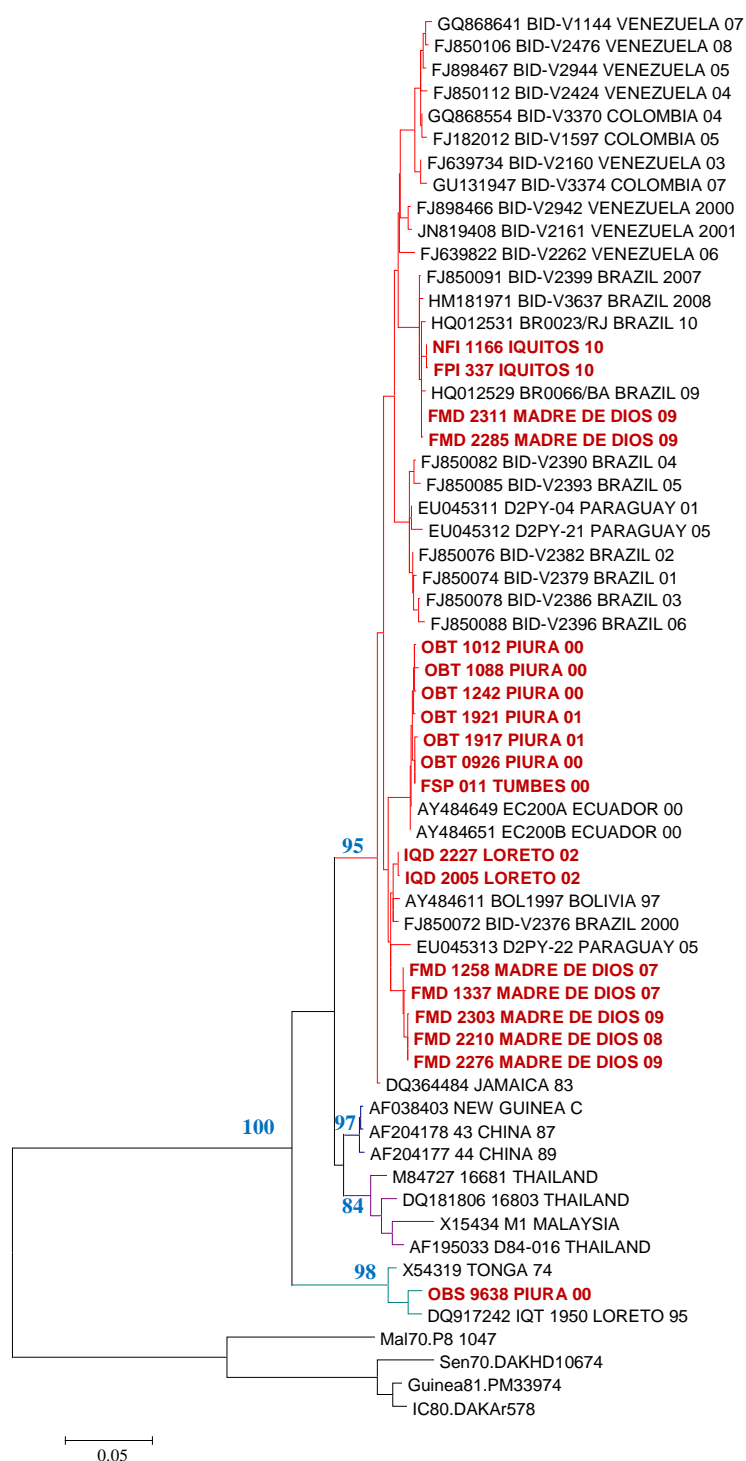


Figura 8. A) Árbol filogenético utilizando el método de Maximun Likelihood. La distancia evolutiva fue calculada con el modelo Tamura-nei. Los valores de confianza fueron determinados usando 1000 replicaciones de Bootstrap. Solo se muestra los valores de Bootstrap ≥ 70 en cada genotipo.

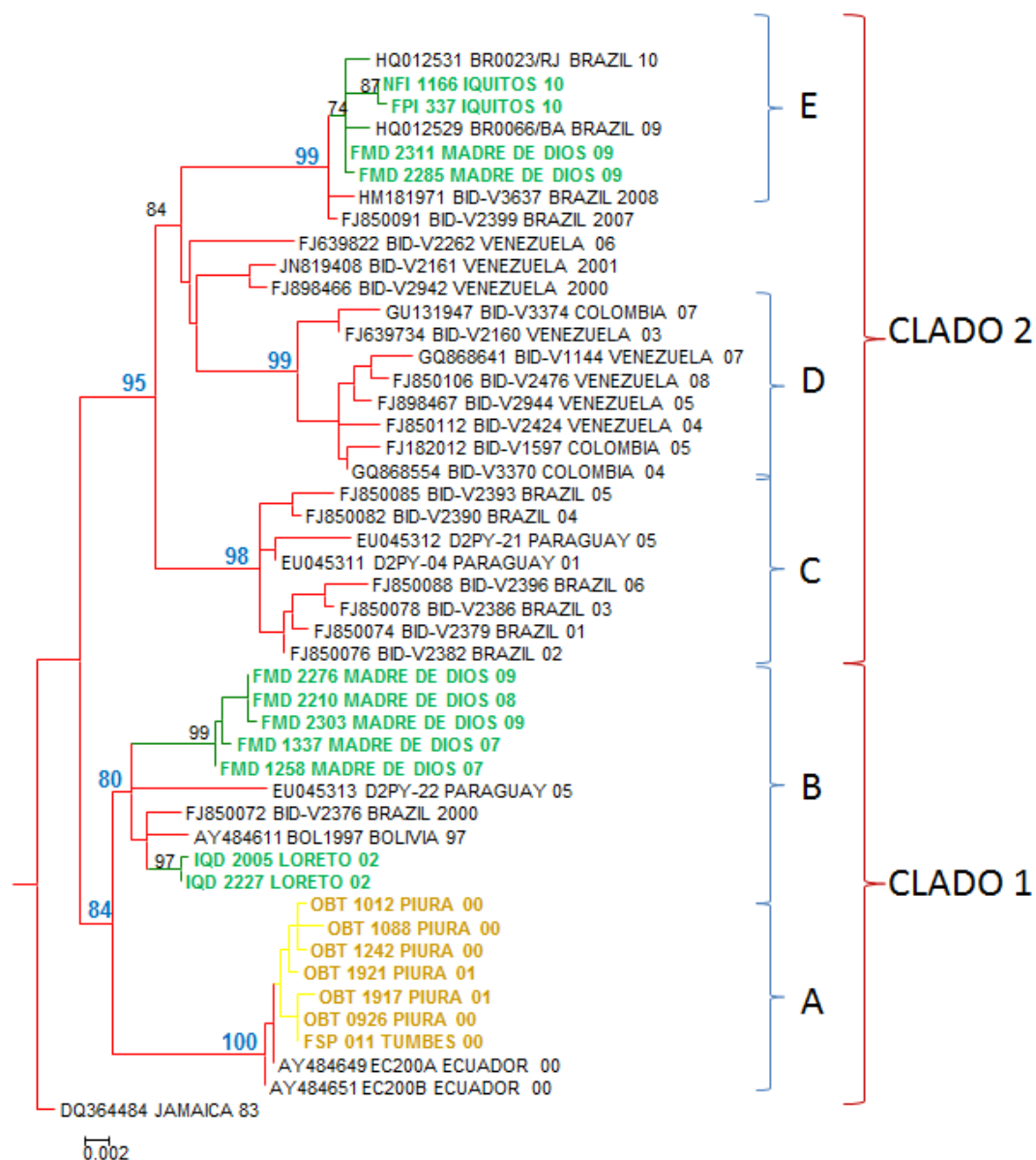


Figura 8. B) Rama del genotipo Americano/Asiático mostrando los diferentes clados (1 y 2) y sub-clados (A, B, C, D y E). Solo se muestran los valores de bootstrap importantes (≥ 70) para el análisis.

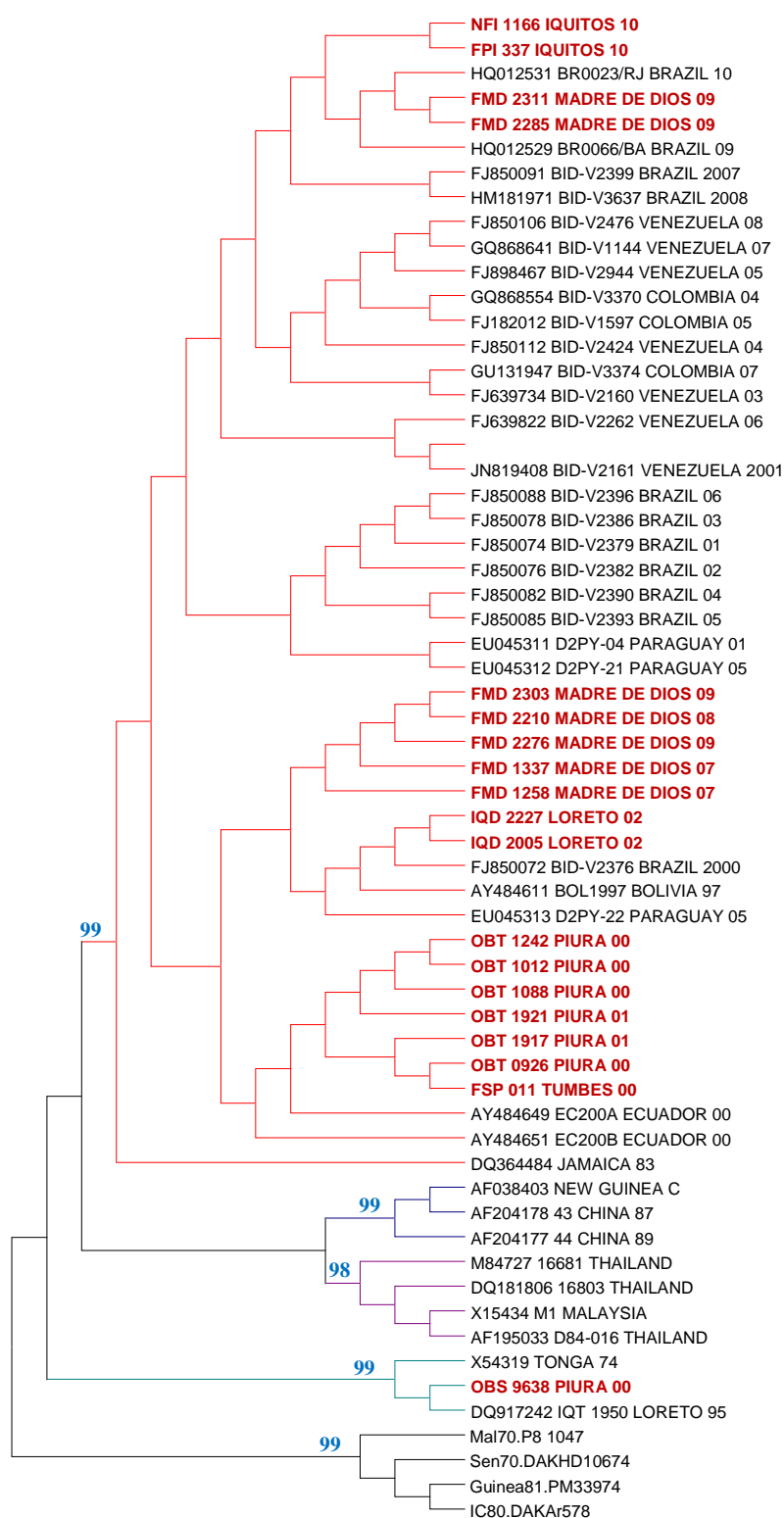


Figura 9. A) Árbol filogenético utilizando el método de Parsimonia. Los valores de confianza fueron determinados usando 1000 replicaciones de Bootstrap. Solo se muestra los valores de Bootstrap ≥ 70 en cada genotipo.

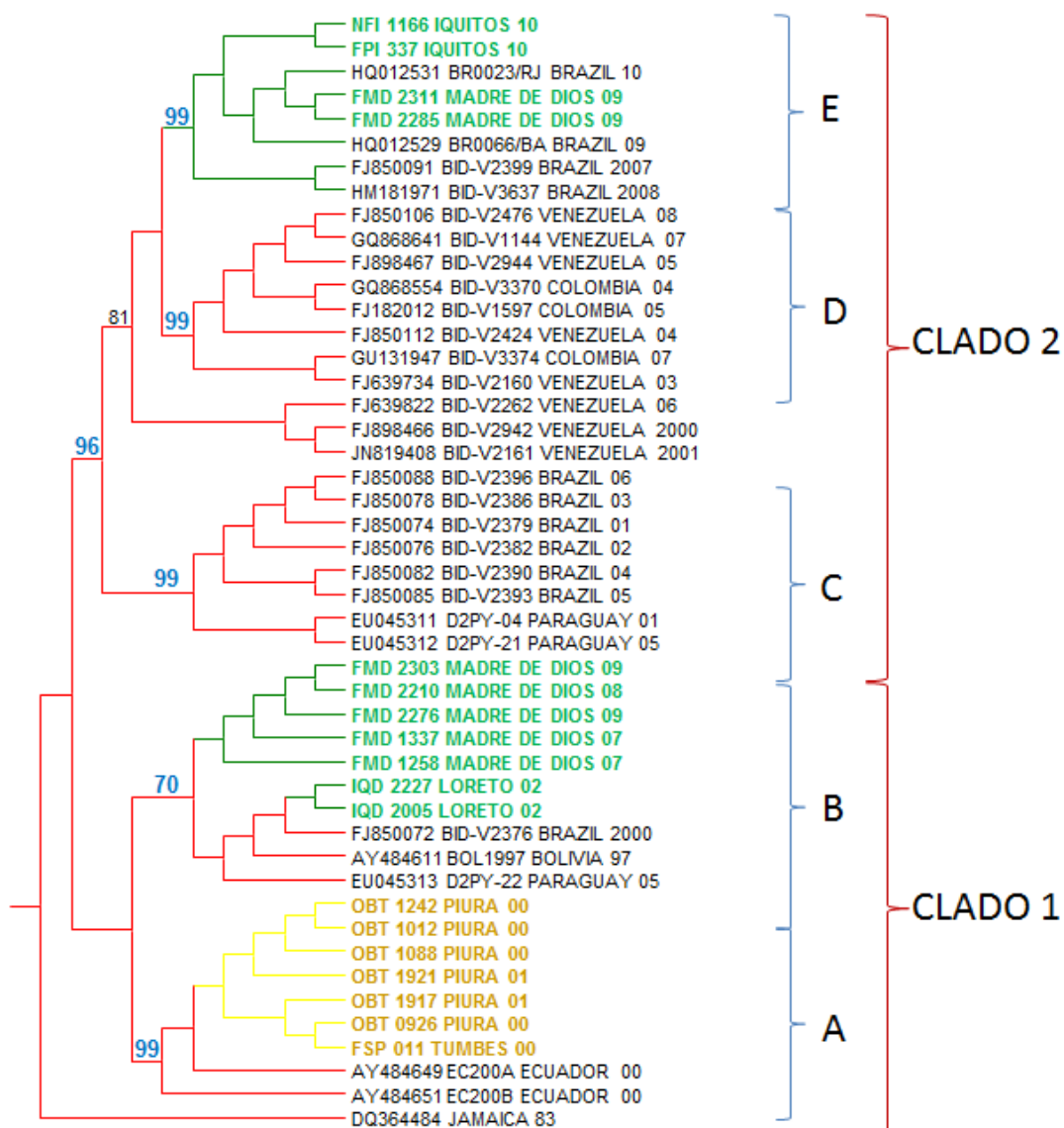


Figura 9. B) Rama del genotipo Americano/Asiático mostrando los diferentes clados (1 y 2) y sub-clados (A, B, C, D y E). Solo se muestran los valores de bootstrap importantes (≥ 70) para el análisis.

El genotipo circulante predominante en nuestro país fue de origen asiático, asociado previamente a epidemias severas y que ha circulado en Latinoamérica por un periodo de más de 20 años desde su ingreso y primera identificación como genotipo III ([Rico-Hesse, 1990](#)). Se determinó la co-circulación de los genotipos Americano y Americano/Asiático durante el brote ocurrido en el norte peruano en el 2000 y además reportamos que el genotipo Americano no fue detectado desde el 2000 en adelante, sugiriendo que fue desplazado por el Americano/Asiático, confirmando lo previamente reportado y sugerido en un estudio realizado durante un brote en los años 2000-2001 ([Montoya, 2003](#)), donde por técnicas de análisis de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) identificaron cepas de origen asiáticas, ahora conocidas en la presente tesis como Asiático/Americanas.

De acuerdo con la información que proporcionan los arboles filogenéticos y teniendo en cuenta la similitud entre las cepas circulantes de los países vecinos con nuestras cepas; se pudo determinar en general que las variantes genotípicas que circularon por la costa norte fueron las mismas que se aislaron en Ecuador y las variantes aisladas por la región de la selva están relacionadas con las de Brasil, Bolivia y Paraguay.

Así mismo se pudo distinguir que estuvieron circulando en nuestro país dos clados mayores del genotipo Americano/Asiático. Estos clados comprenden los previamente reportados en estudios realizados en Paraguay y Brasil ([Aquino, 2008](#); [Oliveira, 2010](#)). El clado 1 está conformado por las cepas aisladas de Piura, Tumbes, Loreto y Madre de Dios desde los años 2000 al 2009 y el otro clado 2 comprende las cepas aisladas de Madre de Dios y Loreto en los últimos 2 años del análisis.

Dentro del clado 1 apreciamos que las cepas de Piura y Tumbes aisladas en el 2000 y 2001, están estrechamente relacionadas con las aisladas en Ecuador el 2000, estos resultados confirman lo reportado en un estudio basado en el gen de la cápside ([Montoya, 2003](#)). Los aislamientos obtenidos de Loreto y Madre de Dios hasta el 2009 están relacionados con las cepas

circulantes en Brasil el 2000. Además se puede distinguir claramente la distribución de las cepas en dos sub-clados dentro del clado 1 y que corresponden con la distribución geográfica de dichos aislamiento; un sub-clado (A) formado por las cepas de la costa norte (Perú-Ecuador) y el otro sub-clado (B) relacionado con las cepas de la selva oriente (Perú-Brasil-Bolivia-Paraguay).

El clado 2 está conformado por las cepas circulantes durante los años 2009-2010 en la región de la selva y que están relacionadas con las cepas circulantes en Brasil durante el 2007 al 2010. En este clado se distinguen tres sub-clados; un sub-clado conformado por cepas brasileras, paraguayas y bolivianas (sub-clado D), otro conformado por cepas venezolanas y colombianas (sub-clado C), y el tercero por peruanas y brasileras (sub-clado E).

La emergencia del genotipo Americano/Asiático coincide con el aumento de casos severos en Perú, como también lo han reportado otros países de Latinoamérica (Benett, 2006; Foster et al., 2004; Ricco-Hesse, 1997; Uzcategui et al. 2001). En Perú la introducción en el norte del país de una cepa en el 2000 proveniente de Ecuador, estuvo relacionada a la aparición de casos severos de dengue durante un gran brote reportado en 2000-2001 ([Montoya, 2003](#)). Luego de 10 años la introducción de una nueva cepa de Brasil en la selva, inicialmente por Madre de Dios y posteriormente diseminada a la selva norte, generó un gran brote de dengue en Iquitos con aumento de casos severos de la enfermedad, convirtiéndose en el más largo en la historia del Perú ([Durand, 2011](#)).

El ingreso de una nueva cepa y remplazo de clados parece preceder a la aparición de un brote con casos severos; casos similares fueron previamente reportados en Brasil ([Oliveira, 2010](#)) y Paraguay ([Aquino, 2008](#)).

Rutas de entrada a Perú fueron previamente descritas para otros serotipos de dengue. Análisis filogenéticos realizados en VDENV-3 determinaron que este virus ingreso por Ecuador al norte peruano, pero la diseminación a la

selva peruana no fue claramente establecida ([Kochel, 2008](#)). Respecto al VDEN-4 el análisis filogenéticos también determinó un ingreso al norte peruano y su posterior diseminación a la selva noreste ([Forshey, 2009](#)).

La divergencia genética entre las cepas secuenciadas sugiere que las variantes (clados) fueron introducidas independientemente por el Ecuador al norte peruano y por Brasil o Bolivia a la selva sureste durante los diez años analizados. Esto nos indicaría que antes de que ocurran brotes por este serotipo en Perú, primero suceden en los países vecinos y que debemos estar alertas sobre todo si detectan una nueva cepa circulante.

La información obtenida del análisis filogenético es de suma utilidad para entender el comportamiento del VDEN-2 en Perú y para establecer estrategias de vigilancia epidemiológica. Sin embargo debemos recordar la naturaleza multifactorial de la enfermedad del Dengue a la hora de establecer estrategias integrales.

4.4 Análisis de la secuencia aminoacídica del gen E

La comparación de las secuencias entre las cepas aisladas mostró cambios aminoácidos según lugar de aislamiento y genotipo de VDEN-2.

Para el caso del genotipo americano aislado en el 2000 (OBS 9638) la secuencia aminoacídica mostro variación mínima de tan solo una sustitución de arginina (R) por glutamina (Q) a nivel del aminoácido 167 con respecto a la cepa aislada en 1995 en Loreto (IQT 1950), pero de ningún cambio con respecto a la cepa referencial TONGA 74 aislada en 1974. Esto sugiere que la cepa Americana tiene una tasa de mutación baja en relación a los demás genotipos de VDEN-2, corroborando lo ya comentado en previas publicaciones ([Cologna & Rico-Hesse, 2003](#)).

Con respecto a las cepas aisladas pertenecientes al genotipo asiático y tomando como referencia la secuencia de la cepa Americana Tonga 74; existen aminoácidos en común entre todas las cepas asiáticas y que además los diferencian de las cepas americanas. Estas se encuentran en el aminoácido 71 con una sustitución de ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E); en el 81 de treonina (T) por serina (S); en los aminoácidos, 91, 139 y 162 de valina (V) por isoleucina (I); en el 390 de D por asparagina (N); en el 484 de I por V; y en el 491 de V por alanina (A). Todas estas sustituciones también se apreciaron en secuencias obtenidas del GenBank de cepas de Ecuador, Colombia, Brasil, Bolivia. Sin embargo de todos estos cambios el ocurrido en el aminoácido 390 se consideraría importante debido a que es el cambio de uno cargado negativamente como D por uno sin carga como es la N, la presunción de que dicho cambio es la causa de la mayor virulencia de la cepa asiática con respecto a la americana fue previamente observado ([Twiddy, 2002](#)).

Con respecto a los cambios aminoacídicos de las cepas aisladas en Perú en diferentes regiones y años encontramos que en las cepas aisladas de Piura durante los años 2000-2001 existen cambios ocurridos solo en dichas cepas como en el aminoácido 118 donde se encuentra una sustitución de metionina (M) un no polar por lisina (K) un polar positivo; en el aminoácido 432 de isoleucina (I) por leucina (L) y en el aminoácido 491 se conserva la valina (V) donde las demás cepas asiáticas lo cambian por una alanina (A). Estos cambios se presentan también en las cepas de Ecuador.

Para el caso de las cepas aisladas en Loreto 2002 hay dos cambios ocurridos solo en estas cepas uno en el aminoácido 43 donde la fenilalanina (F) es sustituida por una L y otro en el aminoácido 160 donde la K (carga positiva) es sustituido por E (carga negativa); este último cambio también lo presentan las cepas de Brasil del 1990 al 2000 y la cepa de Bolivia de 1997. Sustituciones en el aminoácido 131 de Q (polar) por L (no polar) y en el 203 de D por E están presentes en las cepas aisladas desde el 2000 hasta parte del 2009, es decir en todas las cepas pertenecientes al clado 1 del genotipo Americano/Asiático. Estas variaciones también la presentan las cepas de Brasil desde 1990 hasta el 2003, las cepas de Colombia 1992-1998 y la cepa de Bolivia de 1997, obtenidas del GenBank.

Las cepas aisladas desde la segunda parte del 2009 hasta 2010 (clado 2) no presenta variación en el aminoácido 129, donde las demás cepas asiáticas sustituyen I por V; pero si presentan sustituciones en los aminoácidos 170 de I por T; 340 de M por T y en el 380 de I por V; siendo los dos primeros cambios de un no polar a polar. Estos mismos cambios lo presentan las cepas de Brasil del 2007-2010. En el aminoácido 340 hay una sustitución de M por T que lo presentan las cepas aisladas pertenecientes al clado 2, además de las cepas de Brasil (2007-2010) y Colombia (1999-2007). En el aminoácidos 380 existe un cambio de I por V que solo lo presentan las cepas aisladas de madre de Dios y Loreto (parte del 2009 al 2010) y las cepas de Brasil (2003-2010).

Varios cambios en aminoácidos fueron identificados que discriminan entre los genotipos Americano y Americano/asiático los cuales podrían tener consecuencias fenotípicas y epidemiológicas. Cambios aminoacídicos en 130, 203 y 340 fueron encontrados comunes en la mayoría de las cepas sudamericanas estudiadas y que han sido reportados en estudios previos ([Aquino, 2008](#); [Oliveira, 2010](#)). Particularmente los aminoácidos 131 y 340 diferencian entre cepas del clado 1 y clado 2, estos podrían ser utilizados como marcadores para clasificar las cepas en alguno de los dos clados a nivel de Sudamérica, pero se necesita una mayor cantidad de secuencias de diferentes países para corroborar esto.

Se reportaron brotes de casos graves en países de Sudamérica relacionados con la circulación de cepas pertenecientes al clado 2 del presente estudio ([Mamani, 2011](#); [Mendez, 2012](#); [Oliveira, 2010](#); [Romano, 2010](#); [Uzcategui, 2001](#)). De los cambios aminoacídicos observados entre clados, específicamente el aminoácido 131 está localizado en la interface entre el dominio I y II de la región de la envoltura dentro de una región flexible pH-dependiente la cual se pliega dentro del dominio III durante la fusión de la membrana. Mutaciones en esta región puede tener consecuencias en cambios conformacionales y en el umbral de pH durante el proceso de fusión ([Modis, 2004](#)). El clado 2 mostro una sustitución no conservativa en el residuo 131, pasando de un residuo hidrofóbico a un polar hidrofílico comparándolo con el clado 1. Otros estudios son necesarios para verificar si este cambio está relacionado con una aparente mayor virulencia o de mayor estabilidad de las cepas pertenecientes al clado 2.

CAPITULO 5. CONCLUSIONES

El análisis filogenético a partir del gen E de los aislamientos obtenidos durante el 2000 al 2010 confirmaron la circulación de dos genotipos en Perú: el genotipo Americano (hasta el 2000) y el Americano/Asiático (200-2010); siendo este último genotipo el predominante en nuestro país y el cual está relacionada con casos severos de la enfermedad del Dengue en América Latina.

La evolución del genotipo Americano/Asiático del VDENV-2 en Perú está caracterizada por un continuo ingreso de cepas variantes y no por la evolución propia de una cepa establecida.

Perú ha estado recibiendo cepas procedentes de Ecuador y Brasil o Bolivia; los cuales se diferencian y representan clados distintos dentro del genotipo Americano/Asiático. Esto incrementa el riesgo de la presencia de brotes con casos severos con más de una cepa virulenta.

Dos grandes clados (1 y 2) del genotipo Americano/Asiático fueron identificados; a su vez cada uno de estos están compuestos por sub-clados que básicamente están circunscritos a determinadas regiones. Para el clado 1: Ecuador-Costa norte del Perú y Brasil-Selva del Perú, y para el clado 2: Venezuela-Colombia, Brasil-Bolivia-Paraguay y Brasil-Selva del Perú.

CAPITULO 6. RECOMENDACIONES

Se debe estudiar otras regiones o el genoma completo para determinar si existe recombinación entre diferentes cepas de VDEN-2 o si existen cambios importantes que podrían relacionarse con el aumento de la virulencia.

Ampliar los estudios a otros departamentos con casos de dengue 2, para determinar la variedad de VDEN-2 circulante en otras regiones y establecer una ruta de diseminación a lo largo de Perú.

Realizar estudios similares y/o actualizarlos con los otros serotipos de dengue para determinar si siguen el mismo comportamiento del VDEN-2 observado en el presente estudio.

Recomendamos el continuo monitorio de la emergencia de nuevos genotipos de Dengue que podrían estar asociados con casos severos de la enfermedad en Perú y países vecinos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Álvarez, M., Rodriguez-Roche, R., Bernardo, L., Vázquez, S., Morier, L., Gonzalez, D.I., et al. (2006). Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 75(6): 1113–7.
2. Amberg, S.M., Rice, C.M. (1999). Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *J. Virol.*; 73(10):8083-8094.
3. Anderson, R., King, A.D., Innis, B.L. (1992). Correlation of E protein binding with cell susceptibility to dengue 4 virus infection. *J. Gen. Virol.*; 73 (8):2155.
4. Anzai, S., Fukuda, M., Otsuka, Y., Eshita, Y. (2004). Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of dengue type 2 virus isolated in the Dominican Republic. *Virus Genes*; 29(2): 219–227.
5. Aquino, J. D., Tang, W.F., Ishii, R., Ono, T., Eshita, Y., Aono, H. and Makino, Y. (2008). Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res.* 137:266-270.
6. Basu, A., Chaturvedi, U.C. (2008). Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53(3): 287–299.
7. Bennett, S.N., Holmes, E.C., Chirivella, M., Rodriguez, D.M., Beltran, M., Vorndam, V., et al. (2006). Molecular evolution of dengue 2 virus

in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol.* 87(4): 885-93.

8. Boonnak, K., Slike, B.M., Burgess, T.H., Mason, R.M., Wu, S.J., Sun, P., et al. (2008). Role of dendritic cells in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Virol.*; 82(8): 3939—3951.
9. Brooks, A.J., Johansson, M., John, A.V., Xu, Y., Jans, D.A., Vasudevan, S.G. (2002). The interdomain region of dengue NS5 protein that binds to the viral helicase NS3 contains independently functional importin beta 1 and importin alpha/beta-recognized nuclear localization signals. *J. Biol. Chem.*; 277(39): 36399-36407.
10. Burke, D.S., Monath, T.P. (2001). Flaviviruses. In: Knippe, D.M., Howley, P.M., editors. *Fields Virology*. London-New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1043-1125.
11. Cabezas, C. (2005). Dengue en el Perú: aportes para su diagnóstico y control. *Rev. Peru Med. Exp: Salud Pública*; 22(3): 212-228.
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v22n3/a09v22n3.pdf>
12. Cologna R, Rico-Hesse R. (2003). American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol.* 77(7): 3929-38.
13. Conduct, R.C. (2001). Principles of Virology. In: Howley PM, editor. *Fields Virology*. Fourth edition ed. London- New York-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins.
14. Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., Rice, C.M. (1990). Flavivirus genome organization expression and replication. *Ann. Rev. Microbiol.* 44:649-688.

- 15.Despres, P., Frenkiel, M.P., Deubel, V. (1993). Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications or viral structure. *Virology*, 196(1), 209-219
- 16.Diamond, M.S. (2003). Evasion of Innate and Adaptative Immunity by Flavivirus. *Immunology Cell Biology*. 81(3): 196-206.
- 17.Domingo, E. (2002). Quasispecies theory in virology. *J Virol*, 76(1), 463-465.
- 18.Dong, T., Moran, E., Vinh Chau, N., Simmons, C., Luhn, K., Peng, Y., et al. (2007). High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. *PLoS One*; 2(12): e1192.
- 19.Durand, V.S., Fiestas, S.V., Sihuincha, M. M., Chavez, L.C., Vasquez, V. V., Torrejon, F.C., et al. (2011). Impact of the dengue epidemic due to a new lineage of DENV-2 American/ Asian. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 28(1): 157-9.
- 20.Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y.M., Lai, C.J. (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J. Virol*. 62(5): 2467-2475.
- 21.Forshey, B. M., Morrison, A. C., Cruz, C., Rocha, C., Vilcarromero, S., Guevara, C., et al. (2009). Dengue virus serotype 4, northeastern Peru, 2008. *Emerg. Infect. Dis*. 15: 1815-1818.
- 22.Foster, J.E., Bennett, S.N., Carrington, C.V., Vaughan, H., McMillan, W.O. (2004). Phylogeography and molecular evolution of dengue 2 in the Caribbean basin, 1981-2000.*Virology*. 324(1): 48-59.

23. Gubler, D.J. (1987). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. *P. R. Health Sci. J.* 6:107–111.
24. Gubler, D.J. (1989). *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 40:571-578.
25. Gubler, D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Rev.* 11: 480-96.
26. Guha-Sapir, D., Schimmer, B. (2005). Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology. *Emerg Themes Epidemiol*, 2, 1.
27. Guzman, M.G., Kouri, G.P. (1996). Advances in dengue diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3: 621-627.
28. Guzman, M.G., Kouri, G., Valdés, L., Bravo, J., Vazquez, S., Halstead, S.B. (2002). Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev. Panam. Salud Publica*; 11(4): 223–7.
29. Guzman, M.G., Kouri, G. (2004). Dengue diagnosis Advances and Challenges. *International Journal of infectology*, 8: 69-80.
30. Guzman, M.G., Kouri, G. (2008). Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102(6), 522-523
31. Halstead, S.B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, 239(4839), 476-481.
32. Halstead, S.B. (2007). Dengue. *Lancet*, 370(9599), 1644-1652.

33. Halstead, S.B. (2009). Antibodies determine virulence in dengue. *Ann N Y Acad Sci*; 1171 Suppl 1: E48–56.
34. Hirsch, A. (1883). Dengue, a comparatively new disease: its symptoms, p. 55–81. In *Handbook of geographical and historical pathology*, vol. 1. Sydenham Society, London, United Kingdom.
35. Holmes, E.C., Burch, S.S. (2000). The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol.* 8(2): 74–77.
36. Holmes, E.C., Twiddy, S.S. (2003). The Origen, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Gen Evol.* 3(1), 19-28.
37. Howe, G. M. (1977). *A world geography of human diseases*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
38. Jin, X. (2008). Cellular and molecular bases of antibody-denpending enhancement in human dengue pathogenesis. *Future Virol.* 3(4): 343–361.
39. Jaenisch, T., Wills, B. (2008). Results from the DENCO study. TDR/WHO Expert Meeting on Dengue Classification and Case Management. Implications of the DENCO study. WHO, Geneve, Sep 30-Oct 1/2008
40. Johansson , M., Brooks, A.J., Jans, D.A., Vasudevan, S.G. (2001). A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J. Gen. Virol.*; 82(4):735-745.
41. Kindhauser, M.K. (2003). Dengue y fiebre hemorrágica dengue. In: *Defensa Global ante la amenaza de Enfermedades Infecciosas*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. p.140-3.

42. Kliks, S.C., Nimmanitya, S., Nisalak, A., Burke, D.S. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38(2):411-9.
43. Kliks, S.C., Nisalak, A., Brandt, W.E., Wahl, L., Burke, D.S. (1989). Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40(4):444-51.
44. Kochel, T.J., Watts, D.M., Halstead, S.B., Hayes, C.G., Espinoza, A., Felices, V., et al. (2002). Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 360 (9329), 310-312.
45. Kochel, T., Aguilar, P., Felices, V., Comach, G., Cruz, C., Alava, A., et al. (2008). Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Northern South America: 2000--2005. *Infect. Genet. and Evol.* 8: 682-688.
46. Kouri, G.P., Guzman, M.G., Bravo, J.R., Triana, C. (1989). Dengue haemorrhagic Fever/dengue shock syndrome: lessons from de Cuba epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*, 67(4): 375-380.
47. Kouri, G.P., Guzman, M.G., Valdes, L., Carbonel, I., del Rosario, D., Vazquez, S., et al. (1998). Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg. Infect. Dis.*; 4(1): 89-92.
48. Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Chang, G.J., Vorndam, A.V. (1992). Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Mar;30(3):545-51

49. Leitmeyer, K.C., Vaughn, D.W., Watts, D.M., Salas R., Villalobos, I., de Chacon., et al. (1999). Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J. Virol.* 73(6): 4738-47.
50. Libraty, D.H., Young, P.R., Pickering, D., Endy, T.P., Kalayanarooj, S., Green, S., et al. (2002). High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.*; 186(8): 1165-1168.
51. Lin, C.F., Lei, H.Y., Liu, C.C., Liu, H.S., Yeh, T.M., Wang, S.T., et al. (2001). Generation of IgM antiplatelet autoantibody in dengue patients. *J. Med. Virol.* 63(2): 143-9.
52. Lindenbach, B.D., Rice, C.M. (2001). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. P. 991-1041.
53. Lozach, P-Y, Burleigh, L., Staropoli, I., Navarro-Sanchez, E., Harriague J, Virelizier JR, Rey FA, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F y Amara A. (2005). Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J. Biol. Chem.* 280(25): 23698-23708.
54. Mamani, E., Alvarez, C., Garcia, M. M., Figueroa, D., Gatti, M., Guio, H., Merino, S., Valencia, P., Calampa, C., Franco, L., Cabezas, C. 2011. Circulation of a different lineage of dengue virus serotype 2 American / Asian genotype in the Peruvian Amazon, 2010. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* 28: 72-77.
55. Martinez, E. A. (2005) Organizacao de Assistencia Medica durante uma epidemia de FHDSCD. In: *Dengue*. Rio de Janeiro, Editorial Fiocruz, 222–229.

56. Martinez, E. (2008). Dengue. *Estudos Avançados* 22 (64),
57. Mendez, J. A., Usme-Ciro, J. A., Domingo, C., Rey, G. J., Sanchez, J. A., Tenorio, A., et al. (2012). Phylogenetic reconstruction of dengue virus type 2 in Colombia. *Viol. J.* 9:64.
58. Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 427(6972):313-9.
59. Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. (2010). Involvement of the Fc {gamma} receptor IIA cytoplasmic domain in antibody dependent enhancement of dengue virus infection. *J. Gen. Virol.*; 91(1):103-111
60. Monath, T.P., Tsai, T.F. 2002. Flaviviruses. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical virology*. Washington, DC: ASM Press. P. 1097-1151.
61. Montoya, Y. S., Holechek, O., Caceres, A., Palacios, J., Burans, G., Guevara, F. et al. (2003). Circulation of Dengue Viruses in North-Western Peru, 2000-2001. *Dengue Bulletin* 27.
62. Mukhopadhyay, S., Kuhn. R.J., Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(1): 13-22.
63. Murray, J.M., Askov, J.G., wright, P.J. (1993). Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J. Gen. Virol.* 74(2):175-182.
64. Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Desprès, F. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM 3-grabbing-non-integrin is essential for

the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue virus. *EMBO Rep* 4, 723-728.

- 65.Oliveira, M. F., Galvao Araujo, J. M., Ferreira, O. C., Ferreira, D. F., Lima, D. B., et. el. (2010). Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 16:576-578.
- 66.OMS. 2009. Dengue: Guía Para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control.
(http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789995479213_spa.pdf; consultado den junio 2012)
- 67.Ong, A., Sandar, M., Chen, M.I., Sin, L.Y. (2007). Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int. J. Infect. Dis.*; 11(3): 263–7.
- 68.PAHO. (1994). Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Scientific publication no.548. Washington: PAHO.
- 69.PAHO. (2008) Number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), Region of the Americas (by country and subregion). Washington, DC. Pan American Health Organization. (<http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>, consultado en junio 2012).
- 70.Pandey, B.D., Igarashi, A. (2000). Severity-related molecular differences among nineteen strains of dengue type 2 viruses. *Microbiol Immunol.* 44(3): 179–88.
- 71.Preugschat, F., Strauss, J.H. (1991). Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus in vitro and in vivo. *Virology*; 185(2): 689-697.

72. Pryor, M.J., Carr, J.M., Hocking, H., Davidson, A.D., Li, P., Wright, P.J. (2001). Replication of dengue virus type 2 in human monocyte-derived macrophages: comparisons of isolates and recombinant viruses with substitutions at amino acid 390 in the envelope glycoprotein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65(5): 427-34.
73. Quinlos, FN.; Lim, LE.; Juliano, A., Reyes, A. and Lacson, P. (1954). Hemorrhagic fever observed among children in the Philippines. *Philippines Journal of Pediatrics*. 3: 1–19.
74. Rabablert, J., Wasi, C., Kinney, R., Kasisith, J., Pitidhamabhorn, D., Ubol, S. (2007). Attenuating characteristics of DEN-2 PDK53 in flavivirus-naïve peripheral blood mononuclear cells. *Vaccine*; 25(19): 3896–905.
75. RedHum. 2013. Situación del Dengue en la Américas setiembre (www.redhum.org/documento_download/13774, consultado en mayo 2013)
76. Rice, C. (1996). Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN; Krieger DM; Howley PM. *Fields Virology*. New York: 3rd Raven Press.
77. Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 174(2): 479-93.
78. Rico-Hesse, R., Harrison, L.M., Salas, R.A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C., et al. (1997). Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 230(2): 244-51
79. Rothman, A.L, Ennis, F.A. (1999). Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. *Virology*. 257(1): 1-6.

80. Rothman, A.L. (2003). Immunology and immunopathogenesis of dengue disease. *Adv. Virus Res.* 60: 397-419.
81. Rothman, A.L. (2009). T lymphocyte responses to heterologous secondary dengue virus infections. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1171(1): E36–41.
82. Romano, C. M., de Matos, A. M., Araujo, E. S., Villas-Boas, L. S., da Silva, W. C., Oliveira, O. M., et al. (2010). Characterization of Dengue virus type 2: new insights on the 2010 Brazilian epidemic. *PloS one* 5:e11811.
83. San Martin, J.L., Brathwaite, O., Zambrano, B., Solorzano, J.O., Bouckennooghe, A., Dayan, G.H, Guzman, M.G. (2010). The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82(1): 128–135.
84. Shafee, N., AbuBakar, S. (2003). Dengue virus type 2 NS3 protease and NS2B-NS3 protease precursor induce apoptosis. *J. Gen. Virol.* 84(8):2191-2195.
85. Shu, P.Y., Huang, J.H. (2004). Current advance in dengue diagnostic. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11(4): 642-650.
86. Shu, P.Y., Su, C.L., Liao, T.L., Yang, C.F., Chang, S.F., Lin, C.C. et al. (2009). Molecular characterization of dengue viruses imported into Taiwan during 2003-2007: geographic distribution and genotype shift. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80(6): 1039–46.
87. Suárez-Ognio, L., Arrasco, J., Casapía, M., Sihuincha, M., Ávila, J., Soto, G., et al. (2011). Factores asociados a dengue grave durante la epidemia de dengue en la ciudad de Iquitos, 2010 – 2011. *Rev. peru. epidemiol.* 15(1): 17-23.

88. Tassaneetrithep, B., Burgess, T.H., Granelli-Piperno, A., Trumpfheller, C., Finke, J. Wellington, S., et al. (2003). DCSIGN (CD209) mediates DEN infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197: 823-829.
89. Twiddy, S.S., Farrar, J.J., Vinh Chau, N., Wills, B., Gould, E.A., Gritsun, T., et al. (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*; 298(1): 63-72.
90. Twiddy, S.S., Holmes, E.C. (2003). The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol.* 84 (2): 429-440.
91. Ubol, S., Chareonsirisuthigul, T., Kasisith, J., Klungthong, C. (2008). Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology*; 376(2): 290–296.
92. Uzcategui, N. Y., Camacho, D. Comach, G., Cuello de Uzcategui, R., Holmes, E. C., Gould, E. A. (2001). Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *J. Gen. Virol.* 82: 2945-2953.
93. Van der Schaar, H.M., Wilschut, J.C., Smit, J.M. (2009). Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology*; 214(7): 613-629
94. Vazquez, S., Guzman, M.G., Guillen, G., Chinea, G., Perez, A.B., Pupo, M., et al. (2002). Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. *Vaccine*; 20(13-14): 1823-30.
95. Watts, D.M., Porter, K.R., Putvatana, P., Vasquez, B., Calampa, C., Hayes, C.G., et al. (1999). Failure of secondary infection with

- American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 354 (9188): 1431-1434.
96. Wang, W.K., Lin, S.R., Lee, C.M., King, C.C., Chang, S.C. (2002). Dengue type 3 virus in plasma is a population of closely related genomes: quasispecies. *J Virol*, 76(9): 4662-4665.
97. Weaver, S.C., Reisen, W.K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85(2):328-45.
98. World Health Organization. (2009). Dengue and dengue haemorrhagic fever. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>; consultado en mayo 2013).
99. Wu, C.F., Wang, S.H., Sun, C.M., Hu, S.T., Syu, W.J. (2003). Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *J. Virol. Methods*. 114(1):45-54
100. Young, P.R. (1990). Antigenic analysis of dengue virus using monoclonal antibodies. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*; 21(4): 646-651.